

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO *IROQUOIS* DE
DROSOPHILA MELANOGASTER CONTROLAN EL PROGRESO
DEL CICLO CELULAR Y SE REGULAN POR FOSFORILACIÓN
DEPENDIENTE DE MAPK**

Memoria presentada por Natalia Barrios López para optar al grado de
Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora: Dra. Sonsoles Campuzano Corrales

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)
Madrid, Abril de 2012

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	3
1. EL DESARROLLO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.	4
2. EL DESARROLLO DEL DISCO MESOTORÁCICO DORSAL.	5
2.1. Mapa de destino del disco imaginal de ala.	5
2.2. Subdivisión del disco imaginal de ala en compartimentos.	5
2.3. Especificación territorial del disco imaginal de ala.	7
2.4. Formación del patrón de órganos sensoriales en el tórax dorsal.	8
Control de la expresión de los genes proneurales: el prepatrón	9
2.5. Formación del patrón de venas.	9
Especificación temprana de las venas longitudinales.	9
Mantenimiento y refinamiento de las provenas.	11
Diferenciación de las venas adultas.	12
2.6. Crecimiento del disco imaginal de ala.	12
3. EL DESARROLLO DEL DISCO IMAGINAL DE OJO.	13
3.1. Mapa de destino del disco imaginal de ojo.	13
3.2. Especificación territorial del disco imaginal de ojo.	13
Subdivisión del disco imaginal de ojo.	13
Diferenciación del primordio de ojo.	14
3.3. Crecimiento del primordio de ojo.	15
4. EL CICLO CELULAR.	15
4.1. Regulación del ciclo celular.	16
5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	17
5.1. Regulación postraducciona l mediante fosforilación.	18
6. EL COMPLEJO IROQUOIS EN <i>D. MELANOGASTER</i>.	19
6.1. Regulación de la expresión de los genes del C- <i>Iro</i> .	20
6.2. Funciones de los genes del C- <i>Iro</i> .	21
Los genes <i>Iro/Irx</i> en la definición de territorios y bordes organizadores.	21
Los genes <i>Iro/Irx</i> en la formación de patrón.	23
Relación de los genes <i>Irx</i> y cáncer.	24
OBJETIVOS	27

RESULTADOS	29
1. FUNCIÓN DE CAUP EN CICLO CELULAR.	29
1.1. La activación de la vía Dpp no rescata el fenotipo de sobre-expresión de <i>caup</i> .	29
1.2. La apoptosis inducida por la sobre-expresión de <i>caup</i> no justifica la pérdida de tejido.	31
1.3. La sobre-expresión de los genes <i>Iro</i> interfiere con el progreso del ciclo celular.	31
1.4. La sobre-expresión de <i>CycE</i> suprime la interrupción de la proliferación causada por <i>caup</i> .	33
1.5. Los mutantes <i>iro</i> ⁻ muestran un aumento de la proliferación celular.	35
1.6. En los mutantes <i>iro</i> ⁻ disminuye la población de células en G1.	37
1.7. La falta de <i>Iro</i> induce muerte celular.	38
1.8. Regulación por Caup de la actividad de CycE/Cdk2.	39
Caup no modifica la transcripción de <i>cycE</i> o <i>dap</i> .	39
La sobre-expresión de Caup reduce la actividad de CycE/Cdk2, pero no de E2f/dDP.	40
1.9. Caup co-inmunoprecipita con CycE en células S2.	41
1.10. Caup se comporta como un supresor de tumores.	42
Modelo tumoral de inhibición de la vía de Hippo.	42
Modelo tumoral de pérdida de la polaridad celular.	43
Modelo tumoral de activación de Notch y cambio epigenético.	44
2. REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE CAUP DURANTE LA ESPECIFICACIÓN DE LAS VENAS.	47
2.1. La actividad de Erk MAPK es necesaria para la estabilidad de Caup en las provenas.	47
2.2. Interacción de Caup con la vía de Dpp.	51
Caup interacciona genéticamente con p38b MAPK.	51
2.3. Las MAPKs Erk y p38 fosforilan a Caup en células S2.	52
2.4. Actividad de proteínas Caup mutantes puntuales de fosforilación.	54
Las proteínas mutantes puntuales de Caup detienen el ciclo celular.	54
Las proteínas mutantes puntuales de Caup activan la expresión de <i>rho</i> .	56
La proteína mutante puntual Caup ^{TT/AA} es más estable que la proteína silvestre.	56
DISCUSIÓN	59
1. CAUP COMO REGULADOR NEGATIVO DEL CICLO CELULAR.	59
1.1. Efecto de la falta de función de los genes <i>Iro</i> sobre el ciclo celular.	59
1.2. Efecto de la ganancia de función de los genes <i>Iro</i> sobre el ciclo celular.	61
1.3. Modelo regulación del ciclo celular por Caup.	62
1.4. Posibles papeles biológicos de la regulación del ciclo celular por los genes <i>Iro</i> .	63
1.5. Implicación en la formación de tumores.	64

2. REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE CAUP.	65
2.1. Control de la estabilidad de Caup.	66
2.2. Regulación de la actividad transcripcional de Caup.	66
2.3. Modelo de regulación postraduccional de Caup durante la especificación de vena L3.	67
2.4. Búsqueda de las dianas de fosforilación por MAPK en la proteína Caup.	68
CONCLUSIONES	71
MATERIAL Y MÉTODOS	73
1. HERRAMIENTAS GENÉTICAS.	73
1.1. Cultivo de <i>Drosophila</i> .	73
1.2. Estirpes de <i>D. melanogaster</i> .	73
1.3. Análisis clonal.	73
1.4. Obtención de moscas transgénicas.	74
1.5. Montaje de estructuras adultas.	74
2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	74
2.1. Amplificación por PCR.	75
2.2. Obtención de pUAS $\cdot attB$ \cdot HA.	75
2.3. Mutagénesis dirigida.	75
2.4. Obtención de construcciones pUAS-Caup \cdot HA y pUAS-Caup ^{mutantes} \cdot HA.	76
2.5. Obtención de construcciones pAc $\cdot caup$ \cdot HA y pAc $\cdot caup$ ^{mutantes} \cdot HA.	76
2.6. Secuenciación de las construcciones.	77
2.7. Generación de sondas de ARN.	77
3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA.	77
3.1. Cultivo de células.	77
3.2. Transfección de células.	78
3.3. Tratamientos celulares.	78
3.4. Extracción de proteínas.	78
3.5. Inmunoprecipitación.	79
3.6. Western-blots.	79
3.7. Citometría de flujo (FACS).	79
4. MÉTODOS HISTOQUÍMICOS.	80
4.1. Tinción inmunohistoquímica.	80
4.2. Hibridación <i>in situ</i> .	81

5. MÉTODOS DE MICROSCOPIA Y PROCESADO DE IMÁGENES.	82
5.1. Microscopía óptica.	82
5.2. Microscopía confocal.	82
5.3. Procesado de imágenes.	82
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	82
7. MÉTODOS <i>IN SILICO</i>.	82
ANEXO	83
ABREVIATURAS	85
BIBLIOGRAFÍA	87
APÉNDICE	103

SUMMARY

Iro/Irx transcription factors are involved in several processes during the development of *Drosophila* and vertebrates such as territorial specification and pattern formation and indirectly control tissue growth by the generation of organising borders. In this Thesis, gain-of-function and loss-of-function analyses of *Drosophila* Iro-C genes indicate that they are able to directly repress cell proliferation of imaginal disc cells by interfering with cell cycle progression. Overexpression of *caup*, one of the Iro-C genes, prevents cell proliferation, while, conversely, as determined by FACS analysis, insufficiency of Iro proteins causes the cells to accelerate passage through G1 and increases the mitotic index of the mutant territories. We show that overexpression of *caup* inhibits the activity of the CycE/Cdk2 complex, required for S phase entry, without modifying *CycE* transcription. Furthermore, the mutant phenotype associated with *caup* overexpression is recovered by concomitant overexpression of CycE. Moreover, we have been able to detect co-immunoprecipitation of Caup and CycE from S2 cells extracts. These results provide a molecular explanation for the inhibition of the activity of the CycE/Cdk2 complex by excess Caup by the competition of Caup with Cdk2 for CycE binding.

Interestingly, we also show that Iro proteins, which are deficient in several human cancers, are also able to suppress proliferation in three *Drosophila* cancer models suggesting their acting as tumour suppressor genes.

The EGFR pathway controls transcription of Iro-C genes in the wing disc. The results presented in this Thesis suggest that Erk-dependent phosphorylation may control the stability of Caup in the imaginal disc cells. In accordance, Caup is detected as a phosphoprotein in S2 cells and its phosphorylation appears to depend on the activity of the ERK and p38 MAPKs. We propose that ERK dependent phosphorylation of Caup is required for the stability of this protein mainly in the proteins that would allow Caup to participate in the specification and maintenance of vein fate.

INTRODUCCIÓN

El problema de la morfogénesis ha despertado la curiosidad desde épocas muy antiguas. Los primeros estudios que se conocen sobre el desarrollo embrionario fueron realizados por Hipócrates (siglo V a. C.) y Aristóteles (384-322 a. C.). Sin embargo, el gran impulso de la Embriología no llegó hasta el siglo XVII, momento en el que el desarrollo de la microscopía, por van Leeuwenhoek entre otros, dio paso a lo que se conocería como *teoría celular* (Schleiden, 1838; Schwann, 1839, revisado en Baluska y cols., 2004). La aplicación de esta teoría tuvo un gran impacto en esta ciencia y obligó a los biólogos a considerar cada organismo como un conjunto de células individuales e interdependientes que se desarrollan a partir de una única célula.

Había surgido lo que actualmente se conoce como Biología celular, y a finales del siglo XIX los nuevos métodos de tinción desarrollados permitieron describir muchos de los componentes fundamentales de las células: núcleo, cromosomas, mitocondrias, cloroplastos y otras estructuras. Entre 1874 y 1884, Flemming describió las distintas fases de la mitosis demostrando que las células duplicaban su número de cromosomas justo antes de la producción de una célula hija (revisado en Paweletz, 2001).

El siglo XX marcó el *redescubrimiento* de las Leyes de Mendel y se propuso que los cromosomas constuían el material hereditario. Entre 1910 y 1915, Morgan, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo, postuló que los cromosomas contienen los genes (Morgan y cols., 1920). Surgía la Genética como ciencia y *D. melanogaster* se convirtió a partir de entonces en un organismo modelo ampliamente utilizado.

Tras el ascenso de la Genética clásica muchos biólogos se preguntaron cuál era la unidad física y funcional responsable de la herencia. Esto hizo posible que en 1941 Beadle y Tatum desarrollasen la hipótesis “un gen, una enzima” (Beadle y Tatum, 1941). Desde este momento, la Genética del Desarrollo se ha especializado en caracterizar los mecanismos mediante los que los organismos, y cada una de sus células, se desarrollan de un modo particular debido principalmente a la expresión diferencial de sus genes.

En el siglo XXI, la secuenciación de genomas completos nos ha demostrado la alta conservación de las secuencias codificantes y no codificantes entre organismos muy alejados evolutivamente. Ante nuestra sorpresa, “los mismos genes” y “los mismos mecanismos moleculares” son capaces de organizar formas completamente diferentes, e incluso gobernar “los mismos procesos” que en condiciones aberrantes conducen a la enfermedad.

1. EL DESARROLLO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

El plan corporal de *D. melanogaster* se establece alrededor de dos ejes: el eje dorso-ventral y el eje antero-posterior, este último organizado en segmentos. Durante su ciclo biológico pasa por cuatro estadios: embrión, larva, pupa y adulto (o imago) (Figura I1), y sufre una metamorfosis completa durante el estadio de pupa. La duración de cada estadio varía en función de un gran número de factores, de los cuales el más importante es la temperatura.

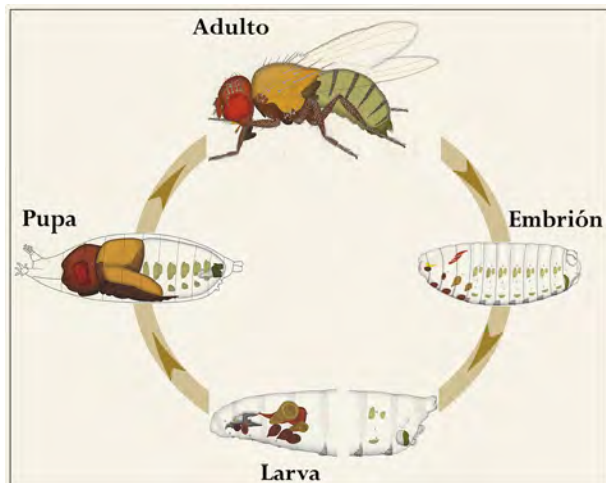


Figura I1. Ciclo de vida de *D. melanogaster*. En cada estadio los primordios de los tejidos adultos se indican con un código de colores correspondiente a la estructura adulta a la que dan lugar. (Imágenes obtenidas de <http://flybase.org>).

El desarrollo embrionario tiene lugar en el huevo, tras la fecundación y formación del cigoto. Terminado el desarrollo embrionario, del huevo emerge una larva que sufre dos mudas hasta alcanzar un tamaño similar al del adulto. Cada periodo entre mudas se denomina “estadio larvario” (LI, LII y LIII). En el último estadio la larva se inmoviliza, su cutícula se oscurece y se fortalece formando el *puparium*. A partir de entonces comienza el periodo de pupa, en el que la mayoría de los tejidos larvarios sufren histólisis y los tejidos y órganos del adulto se ensamblan y diferencian (metamorfosis).

Las estructuras epidérmicas de la cabeza, el tórax, las alas, las patas y la genitalia de la mosca adulta provienen de grupos de células llamados “discos imaginales” cuyos primordios se especifican en posiciones precisas del ectodermo embrionario (Figura I1). Al inicio del desarrollo larvario, cada primordio se invagina y adopta la forma de un saco, con una cara constituida por un epitelio columnar pseudo-estratificado (el disco propio) y la otra formada por un epitelio plano (la membrana peripodial). En los márgenes del disco, en la transición de un epitelio a otro, existe un tercer tipo celular de morfología cuboidal (McClure y Schubiger, 2005) (Figura I2. A, B). En la boca del saco se encuentra el tallo, a través del cual el disco contacta con los tejidos larvarios. Las células de los discos imaginales proliferan activamente durante el periodo larvario (García-Bellido y Merriam, 1971). Durante la metamorfosis, los discos imaginales evaginan y se fusionan con los discos adyacentes para dar continuidad al ectodermo de la mosca adulta.

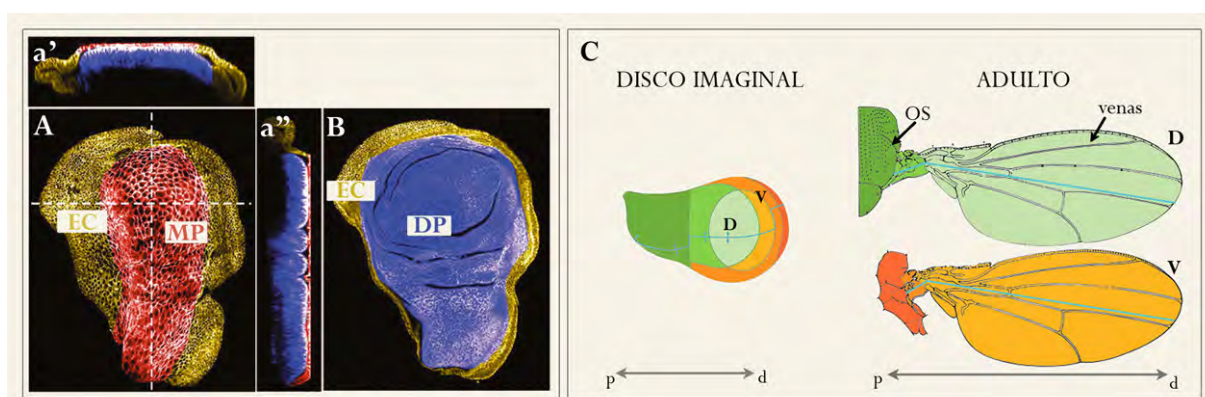
La epidermis abdominal deriva de los nidos de histoblastos, grupos de células imaginales que no invaginan y que proliferan sólo durante la pupación (García-Bellido y Merriam, 1971). En el embrión también se determinan los primordios del tubo digestivo, las glándulas

salivales y la musculatura adulta. Otros órganos larvarios, como los túbulos de Malpigio o el cerebro, no se sustituyen sino que se remodelan durante la metamorfosis.

2. EL DESARROLLO DEL DISCO MESOTORÁCICO DORSAL.

2.1. Mapa de destino del disco imaginal de ala.

El epitelio columnar de cada disco de ala dará origen a un ala, un hemi-notum (o medio tórax dorsal) y la mitad de la pleura mesotorácica del adulto (Figura I2. C), mientras que el epitelio peripodial cumplirá una función mecánica en la eversión y expansión del disco propio (Pastor-Pareja y cols., 2004).



2.2. Subdivisión del disco imaginal de ala en compartimentos.

Los primordios de los discos de ala se especifican en el embrión en el borde antero-posterior (borde A/P) del segundo segmento torácico (revisado en Cohen, 1993). El borde A/P se establece por la expresión diferencial del gen *engrailed* (*en*) en una subpoblación de células que constituyen el compartimento posterior (Kornberg y cols., 1985; Morata y Lawrence, 1975; Tabata y cols., 1995; Zecca y cols., 1995) (Figura I3. A). Por defecto, las células que no expresan *en* forman el compartimento anterior.

Los genes encargados de conferir a las células identidad de compartimento (como *en*) se denominan “genes selectores” (García-Bellido, 1975). La expresión de un gen selector confiere a las células una afinidad diferencial con respecto a las células adyacentes que no expresan dicho gen lo cual impide que se mezclen entre sí. Esta diferencia es heredada por las células hijas y ocasiona que cada compartimento sea un dominio de restricción de

linaje celular (García-Bellido y cols., 1973; García-Bellido y cols., 1976). La división de un territorio celular homogéneo en compartimentos inmiscibles es un proceso fundamental en el desarrollo de *Drosophila* y vertebrados (revisado en Blair, 2003; Kiecker and Lumsden, 2005). Por un lado, la expresión de un gen selector controla la actividad de otros genes y define así la identidad del territorio. Por otra parte, en el borde de los compartimentos se forman centros organizadores que, actuando como fuente de morfógenos, desempeñan un papel esencial en el crecimiento del tejido y en la formación de patrones morfológicos. La distancia de cada célula a las fuentes secretoras de morfógeno, y por tanto la cantidad de morfógeno que recibe, definirá su identidad dentro del compartimento (Blair, 2003).

De este modo, el primer evento de subdivisión en compartimentos que ocurre en el disco imaginal de ala se hereda desde la embriogénesis con la expresión del gen selector *en* en el compartimento P (Figura I3.A). El factor de transcripción En promueve, en las células posteriores, la expresión de *hedgehog* (*hh*) (Lee y cols., 1992; Tabata y cols., 1992) que codifica una proteína secretable la cual actúa como morfógeno de corto alcance en las células anteriores cercanas al borde A/P (Mullor y cols., 1997). Las células del compartimento P no tienen capacidad de responder al propio *hh*, ya que el mismo En reprime a *cubitus interruptus*, efector de la cascada de señalización (Eaton y Kornberg, 1990; Schwartz y cols., 1995). En las células del compartimento anterior más cercanas al borde A/P, la vía de *hh* activa la expresión de *decapentaplegic* (*dpp*) (Basler y Struhl, 1994; Capdevila y Guerrero, 1994; Tabata y Kornberg, 1994) un ortólogo de BMP/TGF β en vertebrados (Padgett y cols., 1987) que actúa como morfógeno de largo alcance controlando proliferación y formación de patrones en todo el disco (Capdevila y Guerrero, 1994; de Celis y cols., 1996a; Grimm y Pflugfelder, 1996 ; Lecuit y cols., 1996).

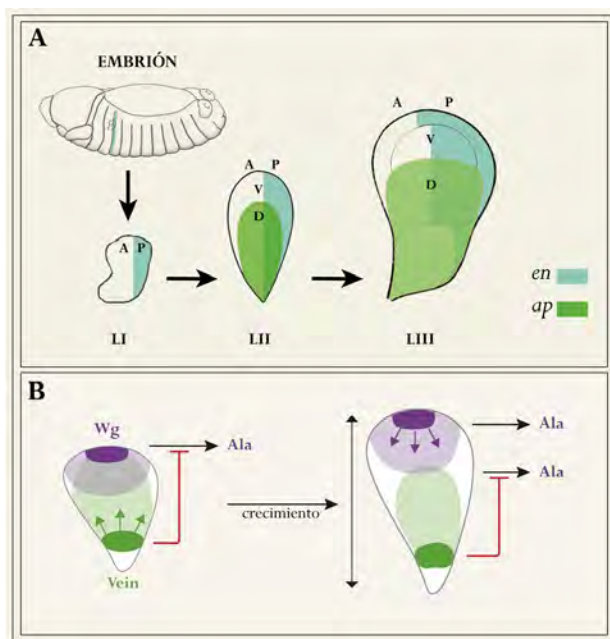


Figura I3. (A) Especificación de compartimentos en el disco de ala. La expresión de *en* y *ap* define los compartimentos posterior (P) y dorsal (D) respectivamente A: anterior; V: ventral. **(B) Especificación de territorios en el disco de ala.** La expresión de *vein* (verde) y *wg* (morado) determinan el desarrollo del notum y el ala respectivamente. (Imagen modificada de Dekanty y Milan, 2012).

A la subdivisión A/P se le suma, durante el segundo estadio larvario, una subdivisión dorso-ventral (D/V) (Figura I3.A). En este caso el gen selector es *apterous* (*ap*) que determina el compartimento dorsal (Blair y cols., 1994; Cohen y cols., 1992; Díaz-Benjumea y Cohen, 1993). La expresión de *ap* depende de la activación temprana de la vía del EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) en la parte proximal del disco (Simcox, 1997; Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002b). *ap*, a su vez activa la expresión de *fringe* (*fng*), una glicosil transferasa que modifica la afinidad del receptor Notch (N) por sus ligandos Serrate (Ser), expresado en el compartimento dorsal, y Delta (Dl), que lo hace en el ventral (Panin y cols., 1997). De esta forma, en el límite entre los compartimentos D y V se activa la vía de señalización de N estableciéndose el borde organizador D/V. Esta ruta de señalización activa la expresión de *wingless* (*wg*) (de Celis y cols., 1996b; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Irvine y Wieschaus, 1994), que codifica un morfógeno de largo alcance que regula proliferación celular (Neumann y Cohen, 1997; Zecca y cols., 1996) y la especificación del margen de ala (Couso y cols., 1994; Phillips y Whittle, 1993).

2.3. Especificación territorial del disco imaginal de ala.

Los compartimentos no se corresponden con divisiones anatómicas del cuerpo de la mosca. La primera subdivisión territorial ocurre en el eje próximo-distal del disco de ala de LII para determinar las regiones de notum, axila y ala (Figura I3.B). La activación de la ruta del EGFR por su ligando Vein (Vn) en la región proximal dorsal del disco promueve la expresión de los genes del Complejo *Iroquois* (*C-Iro*) *araucan* (*ara*) *caupolican* (*caup*) y *mirror* (*mirr*) (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b) mientras que la vía de Dpp reprime distalmente (Cavodeassi y cols., 2002) especificándose así el territorio presuntivo de notum en contraposición al de axila alar (Díez del Corral y cols., 1999).

Simultáneamente, la expresión de *wg* en el compartimento ventral determina el desarrollo del territorio presuntivo de ala (Ng y cols., 1996; Williams y cols., 1993). Vn antagoniza la actividad de Wg, por lo que la distancia entre las fuentes de Wg y Vn, que va aumentando según el disco de ala crece, contribuye decisivamente al desarrollo del ala (Rafel y Milan, 2008; revisado en Dekanty y Milan, 2011) (Figura I3. B).

La especificación del territorio de axila alar depende de la actividad de los genes *teashirt* y *homothorax* (Azpiazu y Morata, 2000; Casares y Mann, 2000). La parte dorsal de la axila requiere también la expresión de *muscle segment homeobox* (*msh*) que delimita la extensión de este territorio reprimiendo la expresión de los genes del *C-Iro* (Villa-Cuesta y Modolell, 2005).

Una vez especificados en el disco los principales territorios con identidad anatómica, aparecen subpoblaciones celulares con diferencias de expresión génica que determinan la formación de los elementos de patrón dentro de cada territorio. En el tórax dorsal estos

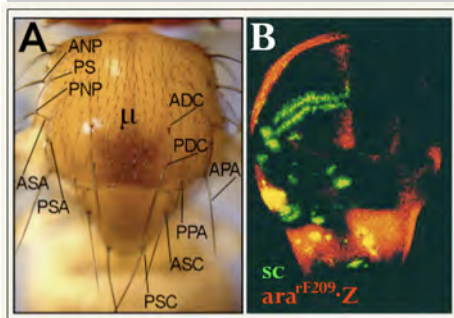
elementos son las quetas, órganos sensoriales (OS) del sistema nervioso periférico (Figura I4. A), mientras que en el ala los elementos de patrón más destacables son las venas (Figura I5. B).

2.4. Formación del patrón de órganos sensoriales en el tórax dorsal.

En la cutícula del tórax dorsal de *Drosophila* aparecen un número invariable de quetas, OS con función mecanorreceptora. Las macroquetas se localizan en posiciones específicas y las microquetas se disponen regularmente en filas (Figura I4. A). Cada OS procede de única célula precursora, la célula madre del órgano sensorial (CMOS), que se divide para dar lugar a las cuatro células que forman cada queta (Hartenstein y Posakony, 1989).

Las CMOS se especifican en los discos imaginales en posiciones concretas definidas por la expresión de los genes proneurales *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*) del complejo *ac/sc* (C-AS) en grupos de células (los denominados grupos proneurales) (Figura I4. B; revisado en Campuzano y Modolell, 1992). Una de las células del grupo proneural acumula niveles más altos de Ac y SC y se determina como la CMOS (Cubas y cols., 1991; Skeath y Carroll, 1991). La restricción de esta alta expresión de *ac/sc* a una única célula del grupo proneural ocurre por un mecanismo de inhibición lateral mediado por la vía de N (revisado en Simpson, 1990) y un mecanismo de retroalimentación positiva dependiente de la vía del EGFR. Ambas vías actúan a través de una secuencia reguladora tipo *enhancer* que permite la autoestimulación de la expresión de *ac/sc* en la CMOS (Culi y cols., 2001; Culi y Modolell, 1998).

Figura I4. Patrón de órganos sensoriales en el tórax dorsal. (A) Tórax dorsal de una mosca adulta de *D. melanogaster*. Se indica el nombre de las 11 macroquetas presentes en cada heminotum asignado por su posición: ANP y PNP, notopleurales (A) anterior y posterior (P); PS, presutural; ASA y PSA, supraalares; APA y PPA, postalares; ADC y PDC, dorsocentrales; ASC y PSC, escutelares. μ , patrón de microquetas. (B) Grupos proneurales en el disco imaginal de ala revelados por tinción con anti-Sc (verde). Se muestra en rojo la expresión de *lacZ*, presente en la inserción *ara^{rF209}*, que se corresponde con la expresión de *ara* y *caup* (Imagen modificada de Gómez-Skarmeta y cols., 1996).



Una vez especificada la CMOS por la acumulación de Ac/Sc, los niveles de estas proteínas decaen drásticamente justo antes de que entre en mitosis (Cubas y cols., 1991; Skeath y Carroll, 1991). La degradación de las proteínas Ac/Sc a través del proteosoma es necesaria para permitir la división de la CMOS, y por tanto para formar el OS, ya que de otro modo Ac y Sc reprimen la expresión de *string* (*stg*), necesario para el paso de la fase G2 a la fase de Mitosis del ciclo celular (Chang y cols., 2008; Edgar y O'Farrell, 1990).

Control de la expresión de los genes proneurales: el prepatrón.

En el disco imaginal de ala el tamaño, posición y forma de los grupos proneurales es altamente reproducible. Esta precisión en el patrón de expresión de *ac/sc* se alcanza por la acción de varias secuencias reguladoras localizadas en la región genómica del C-AS (García-García y cols., 1999; Gómez-Skarmeta y cols., 1995; Romani y cols., 1989; Ruiz-Gómez y Modolell, 1987) que interpretan distintas combinaciones de factores de transcripción presentes en las células como información posicional. Estos activadores y represores transcripcionales se expresan en amplios dominios parcialmente solapantes entre sí y constituyen el denominado prepatrón (Stern, 1954; revisado en Gómez-Skarmeta y cols., 2003).

Algunos de los factores del prepatrón en la región presuntiva de notum son los productos de los genes *spalt/spalt related* (que forman el complejo *sal*), *pannier*, *u-shaped* y los de los genes del C-*Iro* (de Celis y cols., 1999; García-García y cols., 1999; Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Leyns y cols., 1996) (Figura I4. B).

2.5. Formación del patrón de venas.

Las venas del ala de *Drosophila* son tubos de células ectodérmicas más compactadas y con una cutícula más gruesa y oscura que las células de las regiones intervenas adyacentes (Figura I5. B). Su función principal es proporcionar soporte estructural al ala y servir como conducto para la hemolinfa, las tráqueas y los nervios asociados a OS. El patrón de venas de *D. melanogaster* consta de cinco venas longitudinales principales (L1-L5), dos venas incompletas (L0 y L6) y tres venas transversales (anterior, posterior y humeral) (Figura I5. B). No todas las venas son iguales. Una de las propiedades que las diferencia es su corrugación que es dorsal (L1, L3 y L5), ventral (L2) o mixta (L4) según qué parte de la vena sobresale del plano del epitelio.

La especificación de las venas comienza a mitad del tercer estadio larvario en los compartimentos D y V del territorio presuntivo de ala (revisado en de Celis, 2003). Durante la eversión del disco en el periodo pupal, éste se pliega a lo largo del borde D/V y los epitelios D y V se unen por su membrana basal, excepto en las provenas (territorio presuntivo de vena) donde se forman huecos entre los epitelios que darán lugar a las venas. En la formación de las venas intervienen cuatro rutas de señalización: las de Hh, Dpp, EGFR y Notch.

Especificación temprana de las venas longitudinales.

El primer indicio de la especificación de las venas en el disco de ala es una fuerte activación de la vía del EGFR en las células de las provenas (Figura I5. A). Así, en estas células se detecta una alta fosforilación del efector de la vía, la proteína Erk MAPK (*mitogen*

activated protein kinase) (Gabay y cols., 1997) y la expresión de *rhomboid* (*rho*), un gen diana de esta vía (Guichard y cols., 1999; Sturtevant y cols., 1993) que codifica para una proteasa y actúa como retroalimentador positivo de la misma (revisado en Freeman, 2009). La activación del EGFR inhibe la expresión de *blistered* (Roch y cols., 1998) que especificará el destino de intervena (Fristrom y cols., 1994; Montagne y cols., 1996). Además, en el territorio intervena se acumula el factor de transcripción Net que contribuye a impedir la diferenciación a vena (Brentrup y cols., 2000).

No está claro qué induce la activación la vía del EGFR de forma localizada. Vein, uno de los ligandos de EGFR, se expresado entre las provenas L3 y L4 y parece desempeñar un papel instructivo en la inducción temprana de las provenas longitudinales (Schnepp y cols., 1996; Simcox y cols., 1996). Aunque Vn no requiere ser procesado por Rho, se ha demostrado que *rho* es necesario para la activación temprana de EGFR, ya que no se observa ERK di-fosforilado en las células que carecen de *rho* (Guichard y cols., 1999). En el momento en que ocurre la activación de la vía del EGFR, cada provena se puede reconocer por la expresión de factores de transcripción específicos como Ara y Caup del *C-Iro* en las provenas L1, L3 y L5 (Gómez-Skarmeta y cols., 1996), *Knirps* (*kni*) y *Knirps-related* en la provena L2 (Lunde y cols., 1998) y Abrupt en la provena L5 (Cook y cols., 2004) (Figura I5. A). Estos factores determinan la identidad de la provena y son necesarios para su diferenciación.

Las venas longitudinales se forman paralelamente al borde A/P y en su posicionamiento tienen un papel primordial la ruta de Hh y DPP. La señalización por Hh contribuye directamente al patrón de la región central del ala (Crozatier y cols., 2003) regulando la expresión de diversos genes. Uno de ellos es *knot/collier* (*kn/col*), en la intervena L3-L4, necesario para la diferenciación de la vena L4 y de la intervena L3-L4, además de impedir la expresión del EGFR (Crozatier y cols., 2003; Nestoras y cols., 1997; Mohler y cols., 2000; Vervoort y cols., 1999). Por otro lado, la vía de Hh, junto con Dpp, interviene en el posicionamiento de la vena L3 mediante la activación de los genes *ara* y *caup* en la provena L3 (Gómez-Skarmeta y cols., 1996) (Figura I5. A).

El papel de Dpp en la formación del patrón de venas está mediado principalmente por los factores de transcripción del complejo *sal*. Dpp se expresa en la intervena L3-L4 (Posakony y cols., 1990) y difunde hacia anterior y posterior activando *sal* en un dominio que se extiende desde la vena L2 hasta cerca del borde anterior de la vena L5 (de Celis y cols., 1996a; Lecuit y cols., 1996). Allí, *sal* contribuye al posicionamiento de las venas L2 y L5 regulando la expresión de los complejos génicos *knirps* e *Iroquois* (de Celis y Barrio, 2000; Lunde y cols., 1998).

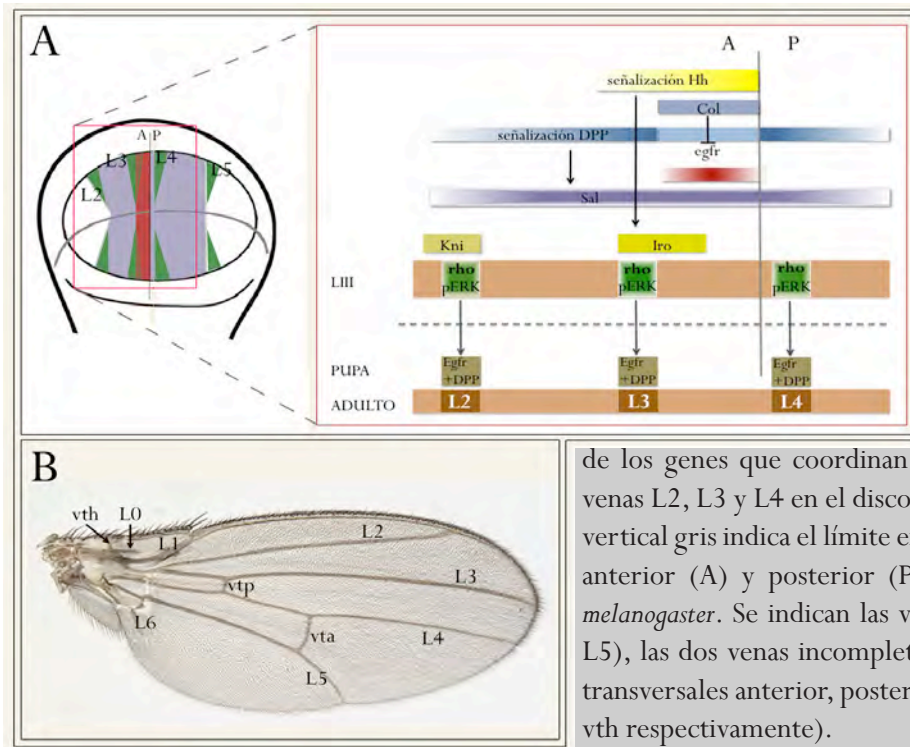


Figura I5.
Especificación de los territorios de vena. (A) Esquema representativo de los patrones de expresión y de señalización

de los genes que coordinan la diferenciación de las venas L2, L3 y L4 en el disco imaginal de ala. La línea vertical gris indica el límite entre los compartimentos anterior (A) y posterior (P). (B) Ala adulta de *D. melanogaster*. Se indican las venas longitudinales (L1-L5), las dos venas incompletas (L0 y L6) y las venas transversales anterior, posterior y humeral (vta, vtp y vth respectivamente).

Mantenimiento y refinamiento de las provenas.

Una vez posicionadas las venas longitudinales en el disco de ala, se inicia un proceso de mantenimiento y refinamiento para limitar las amplias regiones de las provenas a las estrechas venas del adulto. La elección entre el destino de vena o intervena permanece plástica hasta el principio del desarrollo pupal dependiendo de la expresión de genes de vena o intervena (revisado en Blair, 2007).

La actividad del EGFR es necesaria y suficiente para la especificación de vena desde la mitad del tercer estadio larvario hasta el primer día de desarrollo pupal (Díaz-Benjumea y García-Bellido, 1990; Guichard y cols., 1999; Sturtevant y Bier, 1995). Desde el final del tercer estadio larvario la vía del EGFR activa la expresión de los ligandos de N, D1 y Ser en las provenas, momento en que N se expresa a altos niveles en las células adyacentes a cada provena (de Celis y cols., 1997; Huppert y cols., 1997). La activación de la vía de N en estas células da lugar a la expresión de uno de los genes del complejo *Enhancer of split* (*E(spl)mβ*) que restringe la expresión de *rho* al centro de la provena (de Celis y cols., 1997). De esta forma, podemos decir que EGFR tiene una función de mantenimiento del destino de vena y la vía de N en el refinamiento del mismo.

Durante el desarrollo pupal temprano se requiere la señalización por DPP para el mantenimiento de las venas longitudinales. Su expresión entre las venas L3 y L4 se sustituye por otra a lo largo de todas las venas (de Celis, 1997; Yu y cols., 1996). La falta de la expresión pupal de *dpp* causa la pérdida de la parte distal de las venas adultas (de Celis, 1997; Posakony y cols., 1990; Sotillos y de Celis, 2006).

Diferenciación de las venas adultas.

La diferenciación de las venas ocurre al final de periodo pupal y supone cambios en la forma celular y el establecimiento de los contactos celulares apropiados entre las superficies D y V (Milan y cols., 1997a). Estos procesos llevan a las venas a adquirir sus características últimas de pigmentación y corrugación. Aún no se conocen muy bien qué moléculas y vías de señalización intervienen en estos procesos, aunque parece que moléculas de adhesión celular, como Laminina B e Integrinas, confieren ciertas propiedades diferenciales a venas o intervenas respectivamente (Brower y Jaffe, 1989; Fristrom y cols., 1993)

2.6. Crecimiento del disco imaginal de ala.

Como hemos descrito anteriormente, durante el periodo larvario los bordes de compartimentos se convierten en fuentes de los morfógenos Dpp y Wg, que promueven el crecimiento del disco (Capdevila y Guerrero, 1994; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Martin-Castellanos y Edgar, 2002; Neumann y Cohen, 1997; Rogulja e Irvine, 2005; Zecca y cols., 1995) aunque Wg induce parada del ciclo celular en el propio borde D/V (Johnston y Edgar, 1998).

A pesar de la función dependiente de concentración que tienen Dpp y Wg en la especificación celular, todas las células del disco de ala proliferan con una tasa constante e independiente de su posición (Gonzalez-Gaitan y cols., 1994; Milan y cols., 1996b). Tan sólo se observa la existencia de un patrón de proliferación desde el final del tercer estadio larvario con zonas no proliferativas asociadas al borde D/V, las regiones presuntivas de vena y los grupos proneurales (Gonzalez-Gaitan y cols., 1994; Milan y cols., 1996b; O'Brochta y Bryant, 1985; Usui y Kimura, 1992).

Otras rutas de señalización como las del EGFR e Hippo también intervienen en el crecimiento del disco imaginal de ala. Así, la falta de función de algunos de los componentes de la vía del EGFR causa el cese de la proliferación (Díaz-Benjumea y García-Bellido, 1990; Simcox, 1997). Por el contrario, la falta de actividad de la vía de Hippo, a través del control de genes inductores de proliferación como *Cyclin E* (*CycE*), causa proliferación excesiva de las células de los discos imaginales (revisado en Halder y Johnson, 2011).

A pesar de las claras conexiones entre la regulación de la formación de patrón y la del crecimiento, los componentes moleculares que unen la especificación de destinos celulares con la división celular aún no están muy caracterizados.

3. EL DESARROLLO DEL DISCO IMAGINAL DE OJO.

3.1. Mapa de destino del disco imaginal de ojo.

El primordio de disco imaginal de ojo se especifica en el ectodermo embrionario a partir de células procedentes del acron y de 5 segmentos cefálicos (Jürgens y Hartenstein, 1993). El disco de ojo presenta dos territorios morfológicamente diferenciados desde el segundo estadio larvario: el primordio de antena, a partir del cual se origina la antena, el palpo maxilar y la cutícula asociada a estos dos apéndices, y el primordio de ojo que da lugar al ojo, la cutícula orbital y la cápsula cefálica adyacente (Figura I6). Durante la metamorfosis, los discos evaginan y se fusionan para formar las estructuras ectodérmicas de la cabeza (excepto la probóscide).

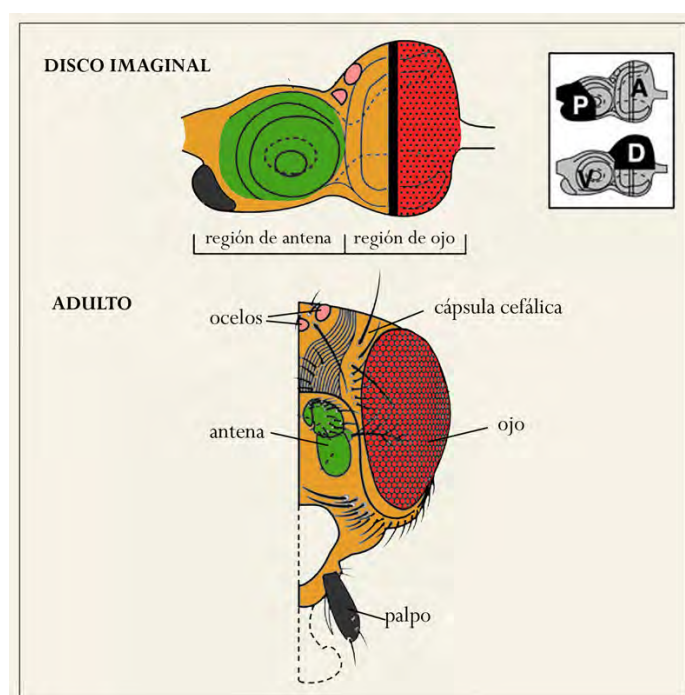


Figura I6. Mapa de destino del disco imaginal de ojo. En el mismo código de color se indican las estructuras adultas y las regiones del disco imaginal de las que derivan. P: posterior; A: anterior; V: ventral; D: dorsal. (Esquema modificado de Held, 2002).

3.2. Especificación territorial del disco imaginal de ojo.

Subdivisión del disco imaginal de ojo.

La subdivisión territorial del disco de ojo comienza en LII cuando la expresión de los genes homeóticos *eyeless/twin of eyeless* y *cut* en dominios complementarios determina la región de ojo y antena respectivamente (revisado en Domínguez y Casares, 2005). A partir de este momento estas dos regiones siguen un patrón de crecimiento y diferenciación independientes.

Durante el segundo estadio larvario, la expresión de los genes del C-*Iro* en la región dorsal del disco generan un borde de restricción de linaje y establece el organizador D/V (Cavodeassi y cols., 1999; Cavodeassi y cols., 2000) que afecta únicamente al primordio de ojo (Figuras I6 e I7). Posteriormente, en el tercer estadio larvario, la expresión de *en* en

la parte más anterior del disco establece la restricción A/P que ata ne exclusivamente a la región de antena (Figura I6; Morata y Lawrence, 1978; Morata y Lawrence, 1979).

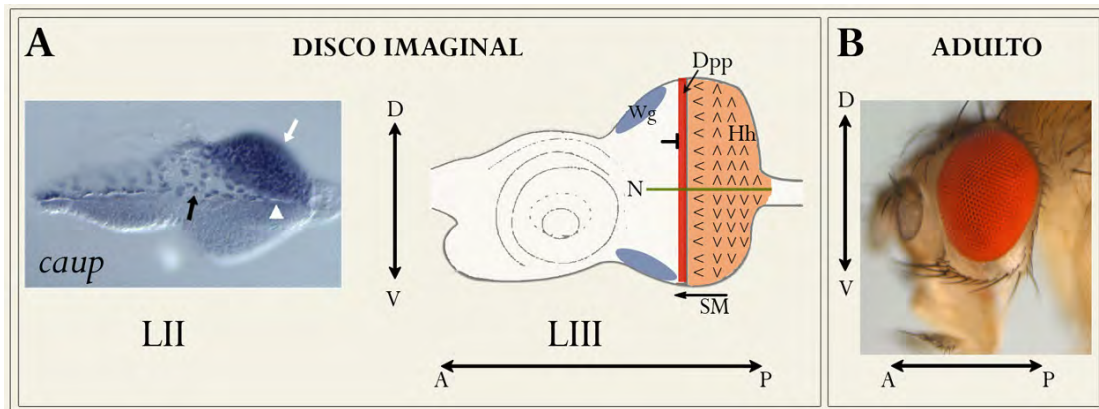


Figura I7. Diferenciación del territorio de ojo. (A, izquierda) En el disco imaginal de larva II, *ara*, *caup* *mirr* se expresan en la región dorsal del disco propio (flecha blanca) y en la membrana peripodial (flecha negra). El límite de expresión de estos genes determina el borde D/V (punta de flecha). (Imagen tomada de Cavodeassi y cols, 2000). (A, derecha) Esquema de un disco imaginal de ojo de larva III. El SM coincide con la expresión de Dpp (rojo), *wg* se expresa en los márgenes anterior D y V (azul) y la ruta de Notch se activa en el límite entre los compartimentos D/V (línea verde). (B) Ojo y cabeza de un adulto. A, anterior; D, dorsal; P, posterior y V, ventral. <, indica la orientación de los omatidios.

Diferenciación del primordio de ojo.

El ojo compuesto de *Drosophila* es una estructura profundamente organizada formada por 750-800 unidades llamadas omatidios. Cada omatidio contiene ocho fotorreceptores, además de cuatro células cono y dos células pigmentarias, que se disponen formando un trapecioide asimétrico. La orientación de los omatidios de la mitad dorsal es opuesta a la de los de la mitad ventral de modo que se origina un eje de simetría especular (el ecuador), que coincide con el borde D/V (Wolff y Ready, 1991) (Figura I7. A).

La diferenciación de los omatidios comienza en el tercer estadio larvario con la aparición del llamado surco morfogenético (SM) en el margen posterior del disco (Ready y cols., 1976). El SM, caracterizado por la constricción apical de sus células, recorre el primordio de ojo de posterior a anterior (Figura I7. A). Las células anteriores al surco se encuentran indiferenciadas, mientras que las células posteriores se organizan en grupos regulares de los que diferenciarán los omatidios (revisado en Hsiung y Moses, 2002). Una de las señales críticas en la iniciación y progresión del SM es la proteína difusible Hh (Heberlein y Moses, 1995; Heberlein y cols., 1993; Ma y cols., 1993). Al inicio, en LII Hh se expresa en el margen posterior del disco y a medida que el SM avanza lo hace en las células ya diferenciadas. Al igual que en el disco de ala, la señalización por Hh activa la expresión de Dpp que desempeña un papel redundante en el progreso del SM (Heberlein y cols., 1993) (Figura I7. A). Por el contrario, Wg, que se expresa en los márgenes dorsal y ventral del

disco, antagoniza la vía de Dpp y la progresión del SM (revisado en Reifegerste y Moses, 1999). Conforme el disco crece la fuente de Wg queda más alejada de la de Dpp y el SM progresa (Kenyon y cols., 2003).

3.3. Crecimiento del primordio de ojo.

La proliferación de las células del disco de ojo es continua y asincrónica desde el primer estadio larvario. Sin embargo, en larva III el SM impone un patrón de proliferación característico en la región de ojo. Las células inmediatamente anteriores se dividen sincrónicamente (primera onda mitótica) inducidas por la señalización de Dpp y Hh. En el SM todas las células se encuentran detenidas en fase G1 del ciclo celular. Entre las células posteriores al SM encontramos dos subpoblaciones: células agrupadas que salen del ciclo celular e inician la diferenciación neuronal, y células indiferenciadas que entran en mitosis sincrónicamente (segunda onda mitótica; Wolff y Ready, 1991).

La vía de N tiene un papel esencial en el crecimiento del primordio de ojo. En el segundo estadio larvario, la expresión dorsal de *wg* y *hh* activa a los genes del C-Iro en todo el territorio dorsal (Billioni y cols., 2005; Cavodeassi y cols., 1999; Maurel-Zaffran y Treisman, 2000) (Figura RI7. A). Las proteínas Iro restringen la expresión de *fng* a la mitad ventral del primordio (Cavodeassi y cols., 1999; Dominguez y de Celis, 1998; Yang y cols., 1999). La confrontación de células *fng*⁺ y *fng*⁻ induce la activación de la vía de N en el borde D/V (Cho y Choi, 1998; Dominguez y de Celis, 1998; Papayannopoulos y cols., 1998) mediante un mecanismo similar al que opera en el borde D/V del disco de ala (ver más arriba). Del mismo modo, la confrontación de células que expresan los genes del C-Iro con otras que no lo hacen genera un borde D/V (Cavodeassi y cols., 1999) (Figura I11. C).

La señalización por N desde el borde D/V promueve el crecimiento global del disco (Cho y Choi, 1998; Domínguez and de Celis, 1998) a través de la activación de la expresión del gen *eyegone* (*eyg*) tanto en las células del compartimento D como del V (Chao y cols., 2004; Domínguez y cols., 2004). N y Eyg inducen la expresión de *unpaired*, ligando que activa la ruta de señalización de JAK/STAT a larga distancia y promueve la proliferación celular (Chao y cols., 2004).

4. EL CICLO CELULAR.

El plan básico del ciclo celular eucariótico que opera en la mayoría de las células somáticas consta de una fase de síntesis (fase S), una fase mitótica (fase M) y dos fases intermedias (fases Gap, G1 y G2) (Figura I8). La entrada en una fase depende del progreso adecuado de la fase previa. La fase G1 también se denomina fase de crecimiento y su duración es muy variable dependiendo del tipo celular. Durante esta fase se produce la síntesis de

la maquinaria necesaria para que tenga lugar la fase S. En la fase S se replica el ADN, y los niveles de transcripción y síntesis proteica disminuyen notablemente. Una vez duplicado el ADN, la célula entra en fase G2 y aumenta la síntesis de la maquinaria requerida para la fase M. Por último, en la fase M tiene lugar la división nuclear y la citoquinesis.

4.1. Regulación del ciclo celular.

La regulación del ciclo celular es fundamental para asegurar la supervivencia de la célula así como para evitar una división incontrolada de la misma. Los mecanismos moleculares que rigen el avance del ciclo son secuenciales y promueven un sentido único. De este modo, la célula se asegura de que cada paso sea irreversible.

Muchos de los genes que codifican proteínas clave en la regulación del ciclo celular se han conservado a lo largo de la evolución. Cabe destacar dos clases de proteínas, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Las ciclinas por sí mismas no tienen función catalítica pero son necesarias para la activación de las Cdks. Las Cdks se expresan constitutivamente en las células, mientras que las ciclinas son sintetizadas y degradadas periódicamente. La combinación Ciclina/Cdk específica de cada fase activa o reprime, mediante fosforilación, a diversas proteínas coordinando así la entrada en la siguiente fase del ciclo (revisado en Grana y Reddy, 1995). A continuación describimos los principales reguladores del ciclo celular en *Drosophila* (Figura I8), aunque conviene anotar que existen algunas diferencias dependiendo del tipo celular (revisado en Lehner y cols., 1992).

En fase G1, *cyclin D* (*CycD*) es el primer gen que se expresa en respuesta a señales extracelulares. *CycD* se une a Cdk4 permitiendo la fosforilación, entre otras, de la proteína Retinoblastoma (Rbf). La fosforilación de Rbf conlleva su disociación del complejo E2f/dDP/Rbf de modo que el heterodímero E2f/dDP puede activar la transcripción de genes como *CycE*, y *pcna* (*proliferating cell nuclear antigen*) (Duronio y cols., 1996; Royzman y cols., 1997; Yamaguchi y cols., 1995).

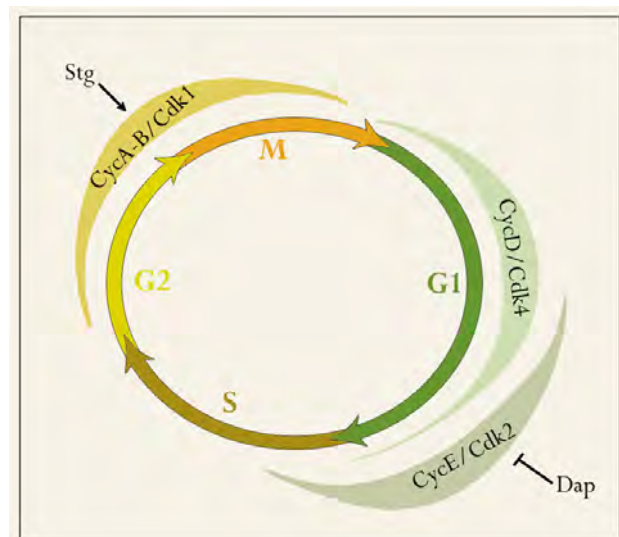


Figura I8. Fases y regulación del ciclo celular. Se indica el nivel de actividad los complejos Ciclina/CDK que actúan en cada fase. Dap y Stg son dos de los principales reguladores de los complejos CycE/Cdk2 y CycB/Cdk1, respectivamente.

Al final de la fase G1 los altos niveles de CycE alcanzados permiten su unión a Cdk2 (Cdc2c) (Lehner y O'Farrell, 1990) formando el complejo CycE/Cdk2 el cual hiperfosforila

e inactiva a Rbf (Du y Dyson, 1999; Du y cols., 1996) entre otras dianas (revisado en Möroy y Geisen, 2004). La actividad de CycE/Cdk2 es necesaria y suficiente para inducir la transición de G1 a S (Knoblich y cols., 1994). Los mutantes *cycD* o *cdk4* son viables, siendo CycE/Cdk2 suficiente para permitir el paso por G1 (Emmerich y cols., 2004). Por otro lado, la sobre-expresión de *CycE*, en el sistema nervioso central, puede activar E2f/dDP e inducir la expresión de sus genes diana (Duronio y O'Farrell, 1995; Sauer y cols., 1995) y en el disco de ala la sobre-expresión de *CycE* es suficiente para inducir la entrada en fase S de células que estaban en la fase G1 (Milan y cols., 1996b).

Al inicio de la fase S, el nivel de *CycE* decae y comienza a acumularse Cyclin A (*CycA*). En vertebrados, *CycA* interviene durante la fase S en el control de la expresión, dependiente de E2f, de los genes necesarios para la replicación del ADN y actúa también en la transición G2/M (Pagano y cols., 1992). Sin embargo, en *Drosophila*, *CycA* tan sólo se requiere en el paso de G2 a M (Lehner y O'Farrell, 1989). En este momento, las células también acumulan Cyclin B (*CycB*) cuya función es redundante a la de *CycA*. Ambas interaccionan con Cdk1 (*Cdc2*) que debe ser defosforilada por la fosfatasa String (*Stg*; *Cdc25* en vertebrados; Edgar y O'Farrell, 1990) para activarse completamente y dirigir la división celular. La falta de función de *stg* causa la parada del ciclo en G2 en las células de embriones y de discos imaginales, mientras que la sobre-expresión de *stg* hace que las células en G2 entren rápidamente en fase M (Edgar y O'Farrell, 1989; Edgar y O'Farrell, 1990; Johnston y Edgar, 1998; Milan y cols., 1996a; Milan y cols., 1996b; Neufeld y cols., 1998).

La actividad de las Cdks no sólo está modulada periódicamente por las ciclinas y procesos de fosforilación/defosforilación. La célula posee otros mecanismos para impedir la progresión del ciclo ante daños en el ADN, en ciertas ocasiones durante el desarrollo o como paso previo a la diferenciación. Un papel primordial en la parada del ciclo celular lo tienen los llamados “inhibidores de Cdks” (CKI, revisado en Grana y Reddy, 1995). En *Drosophila*, el gen *dacapo* (*dap*) codifica una CKI de la familia de p21/p27 que se une al complejo CycE/Cdk2 e inhibe su actividad induciendo a la célula a salir del ciclo celular (de Nooij y cols., 1996; Lane y cols., 1996). Por ejemplo, durante el desarrollo del ojo, *dap* se expresa en el SM y en las células posteriores adyacentes coincidiendo con el inicio de la diferenciación de los fotorreceptores (de Nooij y cols., 1995).

5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La regulación de la expresión génica rige los procesos de diferenciación celular y morfogénesis, ya que permite originar los diferentes tipos celulares de un organismo pluricelular. Además es la fuente de adaptabilidad de una célula a las señales externas, daño celular, etc. Esta regulación engloba los mecanismos para el control espacio-temporal, de la cantidad y de la actividad del producto génico, normalmente proteínas. Uno de los últimos niveles de control se lleva cabo mediante modificaciones postraduccionales que pueden ser

de naturaleza muy variada: oxidaciones, glicosilaciones, acetilaciones, proteólisis, unión de moléculas lipídicas, fosforilaciones, ubi-quitinaciones, etc.

5.1. Regulación postraduccional mediante fosforilación.

La fosforilación es una de las modificaciones más comunes de las proteínas. La adición de un grupo fosfato está mediada por proteínas de tipo quinasa y su eliminación por las de tipo fosfatasa. En las células eucariotas la fosforilación normalmente ocurre en residuos de Serina (Ser), Treonina (Thr), Tirosina (Tyr) e Histidina (His) provocando cambios estructurales y funcionales en las proteínas.

La fosforilación tiene una función principal en la “activación en cascada” de muchas de las vías de señalización. La fosforilación secuencial de proteínas quinasa permite la amplificación de la señal iniciada por la unión ligando-receptor y su transmisión a través de la célula. Normalmente, el último componente de la cascada de señalización es una quinasa con capacidad de fosforilar multitud de proteínas diana diferentes. Un ejemplo es la señalización por MAPKs. En *Drosophila* encontramos ortólogos de las tres familias de MAPK: Erk MAPK (codificada por el gen *rolled*; Biggs y cols., 1994); C-Jun N-terminal Kinase (JNK, codificada por el gen *basket*; Sluss y cols., 1996) y dos homólogos de p38 MAPK (*p38a* y *p38b*) (Han y cols., 1998a; Han y cols., 1998b).

Las MAPK intervienen en numerosos procesos durante el desarrollo de *Drosophila* (Adachi-Yamada y cols., 1999b; Duffy y Perrimon, 1994; Noselli, 1998; Ray y Schupbach, 1996; Sturtevant y cols., 1993; Suzanne y cols., 1999). Estas quinasas transducen las señales extracelulares a través de la fosforilación de factores de transcripción o proteínas citoplasmáticas en los cuales la fosforilación puede conllevar la activación o inhibición de su actividad, o a alterar su localización celular, su capacidad para interactuar con otras proteínas, o su estabilidad.

La modificación de la estabilidad proteica es una consecuencia frecuente de la fosforilación dependiente de MAPK. Como ejemplos podemos citar la degradación de Ac y Sc en la CMOS (Chang y cols., 2008), de Yan en los fotorreceptores (Rebay y Rubin, 1995) o de Capicua (Cic) en los polos del embrión o en los discos imaginales (Jimenez y cols., 2000; Roch y cols., 2002) una vez fosforilados por MAPK, dependiente de la activación de un receptor Tirosín quinasa. El efecto de la fosforilación de una proteína depende además del contexto celular. Así, en el caso de Cic, en el epitelio folicular del ovario la fosforilación dependiente de EGFR/MAPK no afecta a su estabilidad sino a su localización subcelular (Astigarraga y cols., 2007).

Otro efecto frecuente de la fosforilación de un factor de transcripción por MAPK es una modificación de su actividad. Así por ejemplo en *Drosophila* la fosforilación de Groucho dependiente de Erk MAPK inhibe su actividad represora (Hasson y cols., 2005).

En vertebrados se ha demostrado que la fosforilación de Irx2 por MAPK dependiente de Fgf8 modula su actividad como factor de transcripción (Matsumoto y cols., 2004).

6. EL COMPLEJO *IROQUOIS* DE *D.MELANOGASTER*.

Como ya se ha indicado más arriba el C-*Iro* contiene tres genes *ara*, *caup* y *mirr* que están estructural y funcionalmente relacionados (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; McNeill y cols., 1997) (Figura I9. A). También incluye otras dos unidades de transcripción, *lincoyan* (*linc*) y *quilapan* (*quil*), cuya falta no parece modificar la función ni la expresión de los genes *Iro* (E. González-Pérez, 2009). Uno de los rasgos más destacados de los genes *Iro* es su organización en complejos que ha surgido por evolución convergente. Mientras que en *Drosophila* hay un único C-*Iro*, en vertebrados éste se ha duplicado, contando con un total de seis genes *Iro* (denominados genes *Irx1-6*) (Gómez-Skarmeta y Modolell, 2002; Irimia y cols., 2008).

Los genes *Iro/Irx* codifican homeoproteínas de la familia TALE (*three amino-acids loop extension*; Burglin, 1997) muy conservadas a lo largo de la evolución. Además del homeodominio (HD), las proteínas *Iro/Irx* comparten una región de 9 amino-ácidos con función desconocida llamada *Iro-box* (Burglin, 1997; McNeill y cols., 1997) y varias dianas putativas de fosforilación por MAPK (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Matsumoto y cols., 2004). Al menos Ara, Caup y Mirr presentan un posible dominio de interacción con proteínas similar al dominio EGF del receptor Notch (Gómez-Skarmeta y cols., 1996) (Figura I9. B).

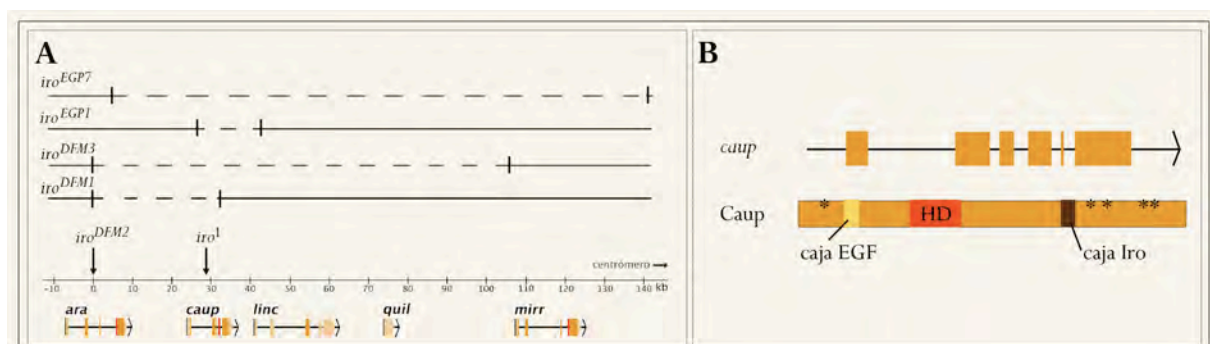


Figura I9. (A) Mapa genético del C-*Iro* y (B) esquema del ARNm *caup* y de la proteína *Caup*. (A) La línea horizontal numerada representa el ADN genómico del C-*Iro* sobre el que se indica la naturaleza de diferentes mutaciones *iro* (las flechas indican puntos de ruptura y las líneas discontinuas la extensión de las deficiencias) (Modificada de E. González-Pérez, 2009). (B) Los rectángulos naranjas en el ARNm representan los exones. Sobre el esquema de la proteína *Caup* se muestra la localización de las cajas EGF e *Iro* y del homeodominio (HD). *, sitios putativos de fosforilación por MAPK.

6.1. Regulación de la expresión de los genes del C-Iro.

La expresión de los genes del C-Iro es muy dinámica a lo largo del desarrollo. Los genes *ara* y *caup* muestran un patrón de expresión casi idéntico entre sí mientras que la expresión de *mirr* difiere en muchos casos. Así por ejemplo, *ara* y *caup* pero no *mirr* se expresan en el embrión en los precursores de los músculos latero-transversales (Carrasco-Rando y cols., 2011) mientras que *mirr* es el único de los genes *Iro* que se expresa en las células foliculares del ovario (Andreu y cols., 2012).

Centrándonos en la expresión de los genes *Iro* en los discos imaginales de ala, como ya indicamos anteriormente en el disco de ala de LII su expresión en el territorio presuntivo de notum depende de las vías de señalización de EGFR y Dpp, que actúan de modo antagonístico (Cavodeassi y cols., 2002; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b; Wang y cols., 2000). *msh* contribuye al mantenimiento del límite distal de la expresión de los genes del C-Iro por represión de la mismos (Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Durante el tercer estadio larvario, la expresión de los genes *Iro* se restringe a la región presuntiva de notum lateral de nuevo por la actividad de la vía de Dpp (Cavodeassi y cols., 2002).

Desde tercer estadio larvario y hasta aproximadamente 40 h después de la formación del puparium los genes *ara* y *caup* se expresan en los territorios presuntivos de vena L1, L3 y L5 (Figura I10. A,B). La expresión en la provena L3 depende de la señalización por Hh y Dpp (Gómez-Skarmeta y Modolell, 1996), mientras que en la provena L5 está regulada por *sal* (de Celis y Barrio; 2000).

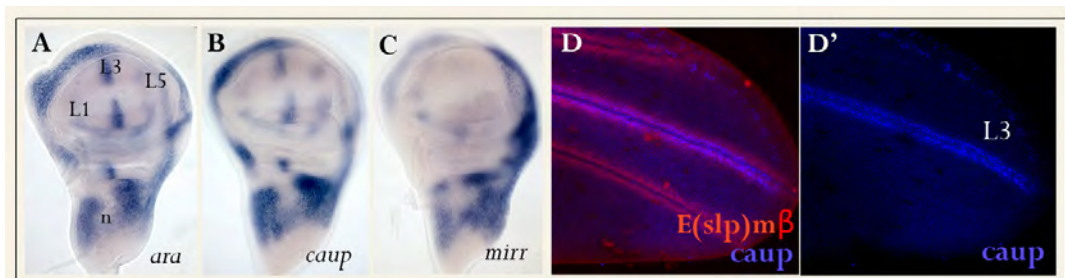


Figura I10. Patrón de expresión de los genes del C-Iro en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario (A-C) y en las venas de pupas de 40h APF (D-D'). n: notum presuntivo, L1, L3 y L5: provenas 1, 3, y 5. (Imágenes donadas por E. González-Pérez). (D-D') Expresión de *Caup* (azul) en vena L3 durante el desarrollo pupal. La expresión de *E(slp)mβ* (rojo) delimita los territorios de vena.

Por otra parte, como hemos comentado anteriormente, la expresión de los genes del C-Iro en el territorio dorsal del disco imaginal de ojo (Figura I7. A) se inicia tempranamente por la señalización por Wg mediada por Pannier (Maurel-Zaffran y Treisman, 2000) y Hh (Cavodeassi y cols., 1999).

Los patrones de expresión del C-*Iro* están definidos espacio-temporalmente por elementos reguladores en *cis* (Gómez-Skarmeta y cols., 1996). Se han identificado cinco elementos reguladores (*IroRE*¹⁻⁵) que dirigen la expresión en los discos imaginales en subdominios de los territorios de expresión de los genes *Iro* (Letizia y cols., 2007). *IroRE*¹ e *IroRE*² integran la señalización de las vías EGFR y Dpp en el territorio presuntivo de notum. Recientemente se ha demostrado que parte de las secuencias reguladoras de la expresión de los genes del C-*Iro* se encuentran en las regiones intrónicas del gen adyacente *sosondowah* situado distal al inicio de transcripción de *ara* (Maeso y cols., 2012).

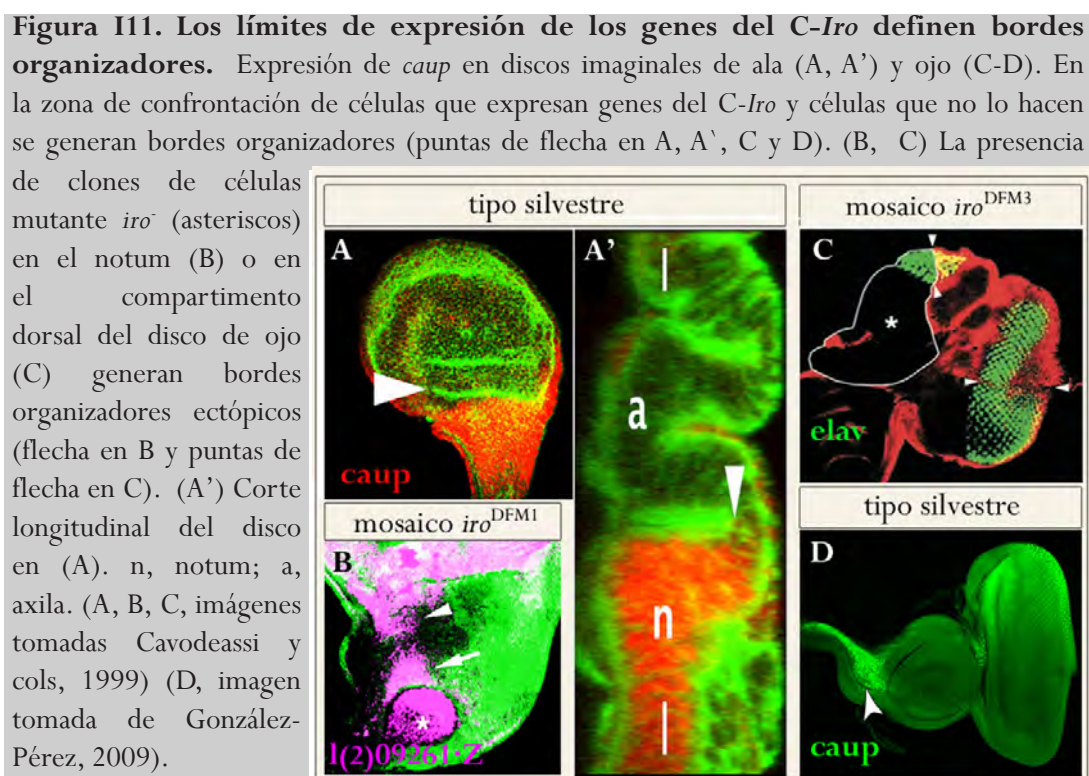
El estudio realizado en *Drosophila* en diferentes mutantes *iro* sobre la transcripción de los genes del C-*Iro* (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; González-Pérez, 2009), de la capacidad reguladora de secuencias intergénicas de los complejos *Iro/Irx* (de la Calle-Mustienes y cols., 2005; Letizia y cols., 2007) y de la estructura tridimensional de los C-*Irx* (Tena y cols., 2011) indica que *ara* y *caup*, *Irx1* e *Irx2* por un lado y *Irx3* e *Irx5*, por otro, comparten secuencias reguladoras mientras que el tercer gen de cada complejo *mirr*, *Irx4* e *Irx6* están regulados de un modo independiente. Se ha hipotetizado que el uso compartido de *enhancers* es lo que ha favorecido el mantenimiento de estos complejos (de la Calle-Mustienes y cols., 2005; Irimia y cols., 2008; Tena y cols., 2011).

6.2. Funciones de los genes del C-*Iro*.

Los genes *Iro/Irx* en *Drosophila* y vertebrados son necesarios, en estadios tempranos del desarrollo, para definir grandes territorios y bordes organizadores, y más tardíamente, para subdividir estos territorios en dominios más concretos y participar en la formación de patrón en los mismos (revisado en Cavodeassi y cols., 2001). A continuación detallamos algunas de las funciones de estos genes en los discos imaginales de ala y ojo.

Los genes *Iro/Irx* en la definición de territorios y bordes organizadores.

Al inicio del segundo estadio larvario los genes del C-*Iro* se expresan en la región más proximal del disco de ala y determinan el territorio presuntivo de notum frente a axila dorsal. Así, los clones de células mutantes *iro*^{DFM3} (una deficiencia del C-*Iro* nula para los tres genes del complejo, Figura I9. A) inducidos durante larva II, provocan malformaciones en el notum adulto, e incluso la aparición de estructuras propias de la axila de forma autónoma y no autónoma (Figura I11. B) (Díez del Corral y cols., 1999). Por otro lado, la expresión ectópica de los genes *Iro* reprime la expresión de genes marcadores del territorio presuntivo de axila (Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Asimismo, la sobre-expresión de *ara* junto con el gen *tailup*, es capaz de dirigir el desarrollo de un notum ectópico (de Navascues y Modolell, 2007).



El nítido borde de expresión distal de los genes *Iro* que separa el territorio de notum del de axila dorsal (Figura I11. A-A') se comporta como un borde organizador que es una fuente de señales difusibles de naturaleza desconocida (Díez del Corral y cols., 1999; Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Hay que destacar que este borde organizador no corresponde a un límite de restricción de linaje (Díez del Corral y cols., 1999). Probablemente, el borde se mantiene por unas propiedades de adhesión diferentes entre las células de ambos lados. De hecho, los clones de células mutantes *iro*⁻ en el territorio presuntivo de notum presentan bordes redondeados que indican que las células *iro*⁻ tienen una mayor afinidad entre sí que con las células adyacentes *iro*⁺ (Díez del Corral y cols., 1999) (Figura I11. B). La aposición de células que expresan un gen *Iro* con otras que no lo hacen modifica el citoesqueleto, la forma y la adhesividad celulares (Villa-Cuesta y cols., 2007).

En el caso del disco imaginal de ojo los genes del C-Iro se expresan en la mitad dorsal desde el segundo estadio larvario (Figura I7. A) donde se requieren para la especificación del ojo y de la cápsula cefálica dorsales (Cavodeassi y cols., 1999; Cavodeassi y cols., 2000). En este territorio, la confrontación de células *Iro*⁺ e *Iro*⁻ establece el borde organizador D/V (Cavodeassi y cols., 1999). Así, los clones de células mutantes *iro*^{DFM3} generan bordes D/V ectópicos con capacidad de dirigir sobrecrecimientos y ojos ectópicos, y reorganizar la polaridad de los omatidios alrededor del nuevo borde D/V (Figura I11. C; Cavodeassi y cols., 1999; Cavodeassi y cols., 2000). Recientemente, se ha identificado un borde organizador asociado al límite de expresión de los genes *Iro* en la membrana peripodial de disco de ojo (Figura I11. D; Gonzalez-Perez, 2009).

La función de los genes del C-*Iro* en la generación de bordes organizadores no es exclusiva de *Drosophila*. Por ejemplo, en vertebrados, el límite de expresión entre los genes *Irx1-5* y *Fezt* en el diencéfalo delimita el borde entre el pretálamo y tálamo, la *zona limitans intrathalamica*, (ZLI, Rodríguez-Seguel y cols., 2009). Las células de la ZLI constituyen un borde de restricción clonal y son fuente del factor difusible *Sonic hedgehog* (Scholpp y cols., 2006).

Mediante la generación de estos bordes, los genes *Iro* tienen un papel indirecto en el control del crecimiento de los discos imaginales. Otros datos sugieren que las proteínas del C-*Iro* también podrían controlar la proliferación celular de un modo autónomo celular. Por una parte, estudios previos basados en condiciones de falta de función de los genes *Iro* habían sugerido un papel de los mismos como represores de la proliferación de las células del compartimento dorsal del ojo (Pichaud y Casares, 2000). Además, E. González-Pérez (2009), observó que los mutantes *iro*^{EGP1} (deleción de *caup*; Figura I9. A) presentaban sobrecrecimientos en la región dorsal del ojo que no están asociados a bordes D/V ectópicos (Figura I12. B). De manera recíproca, la expresión ectópica de *ara* en el disco imaginal de ala genera alas de menor tamaño que las de tipo silvestre (Figura I13. I) (Gómez-Skarmeta y cols., 1996).

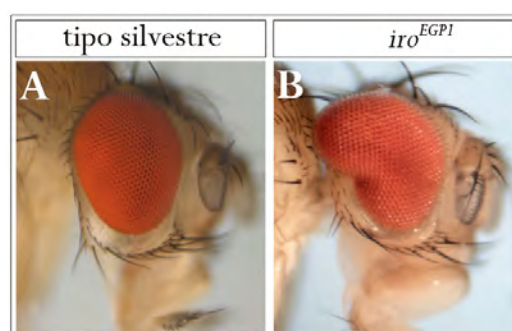


Figura I12. Los mutantes *iro*^{EGP1} muestran sobrecrecimientos de la región dorsal del ojo. (B, Imagen donada por E. González-Pérez).

Los genes *Iro/Irx* en la formación de patrón.

Durante el tercer estadio larvario las proteínas *Iro*, además de conferir la identidad de notum lateral, adquieren un papel esencial en la definición del patrón de OS como componentes del prepatrón. Así, los adultos mutantes homocigóticos *iro*¹ (transposición con un punto de ruptura dentro del gen *caup*, Figura I9. A) desarrollan un notum que carece de todas las quetas laterales (Leyns y cols., 1996). Los genes del C-*Iro*, que se expresan en el tercer estadio larvario en la región presuntiva del notum lateral (Figura I4. B) son necesarios para la expresión de *ac/sc* en los grupos proneurales laterales y por tanto para el desarrollo de las quetas laterales (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Leyns y cols., 1996).

Además, en este estadio, *ara* y *caup* se expresan en las provenas L1, L3 y L5 (Figura I10. A-B). La falta de función de los genes *Iro* conlleva la pérdida de las venas correspondientes en el adulto (Figura I13. C; Gómez-Skarmeta y cols., 1996). *ara/caup* se requieren para la transcripción de *rho* ya que en los mutantes *iro*^{DFM2} (una inversión con un punto de ruptura en *ara*, Figura I9. A) en los que no hay expresión de *ara/caup* en la provena L3 desaparece totalmente la expresión de *rho* en este territorio (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Figura

I13. A, B, D, E). Por otra parte, la expresión ectópica de *ara* o *caup* causa la expansión del dominio de expresión de *rho* en el territorio de ala (Figura I13. H) dando lugar en el adulto a un ala más pequeña con el patrón de venas alterado, con fusión de venas L2-L3 y L4-L5 y material de venas extra (Figura I13. I) (Gómez-Skarmeta y cols., 1996).

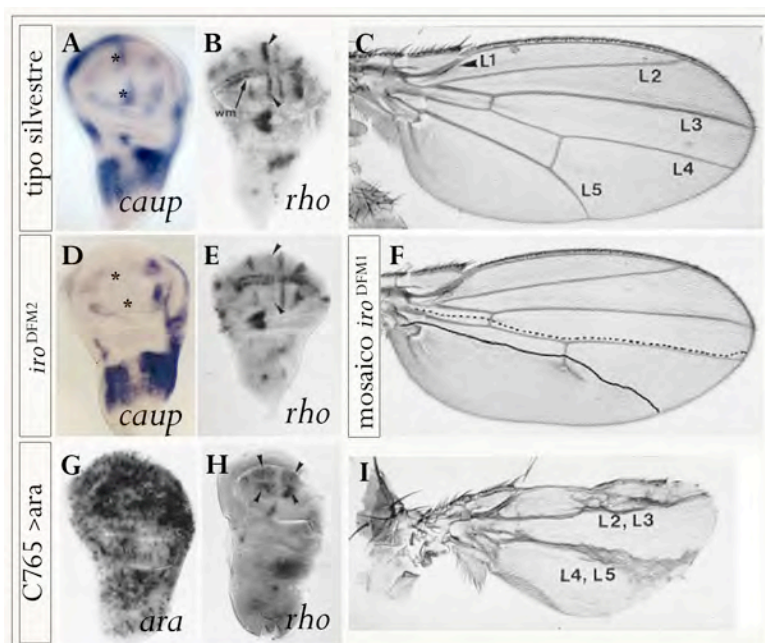


Figura I12. La actividad de los genes *Iro* afecta al patrón de expresión de *rho* y a la formación de venas. (A-F) *ara* y *caup* se requieren para la expresión de *rho* y el desarrollo de las venas. (A, B, D, E) Patrón de expresión de *caup* y *rho* en discos de ala de los genotipos indicados. En los mutantes *iro*^{DFM2} (que carecen de Ara y Caup en el dominio de la provena L3, asteriscos en A y D) desaparece la expresión de *rho* en este territorio (puntas de flecha en B y E). La flecha en (B) señala el margen del ala (wing margin, wm). (F) Ala adulta con un clon de células mwh *iro*^{DFM1} M⁺. Las

líneas continua y punteada indican el límite del clon en las superficies D y V del ala respectivamente. Nótese la falta de la vena L5 (comparar con una ala de tipo silvestre, C). (G-I) La sobre-expresión de *ara* en el disco imaginal de ala modifica la expresión de *rho*, el patrón de venas y reduce el tamaño del ala. Expresión de *ara* (G) y *rho* (H) en discos de ala que sobre-expresan *ara* con la línea Gal4 C765. La expresión ectópica de *ara* hace disminuir el tamaño de la region presuntiva de ala. (I) Ala adulta de una mosca C765 UAS-*ara*. Se aprecia la fusión de las venas L2 con L3 y L4 con L5 y que el tamaño del ala es menor que el de un ala de tipo silvestre (la imagen mostrada en I está ampliada un 30% con respecto a la imagen en C). (Imágenes tomadas de Gómez-Skarmeta y cols., 1996).

En vertebrados también se ha descrito el papel de los genes *Irx* en la formación de patrón. La médula espinal está subdividida dorsoventralmente en regiones por la expresión en dominios solapantes de genes del prepatrón como *Irx3*. La actividad combinada de estos genes del prepatrón definen la diferenciación de los diferentes subtipos neuronales (revisado en Gómez-Skarmeta y cols., 2003).

Relación de los genes *Irx* y cáncer.

En humanos se ha corelacionado la desregulación de la expresión de algunos genes *Irx* con el desarrollo de diversos tipos de cáncer.

Los trabajos de Lu y cols. (2005) y Guo y cols. (2010) demuestran que *Irx1* actúa como supresor de tumores en el desarrollo de cáncer gástrico. Así, la inhibición de la expresión

de *Irx1* mediante metilación del promotor es una característica del carcinoma gástrico mientras que la sobre-expresión de *Irx1* reduce la proliferación y la invasividad de este carcinoma. *Irx1* también parece tener una función supresora de tumores en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Bennett y cols., 2008; Bennett y cols., 2009). En este tipo de cáncer la expresión de *Irx1*, también se encuentra inhibida por metilación de su promotor y el efecto de su sobre-expresión indica una función supresora del crecimiento (Bennett y cols., 2008).

Sin embargo, la inhibición de *Irx5* en células cancerosas de próstata reduce su viabilidad además de causar un aumento de la proteína p21 y un parada del ciclo celular en G2/M, sugiriendo así un papel de *Irx5* como inductor de la proliferación (Myrthue y cols., 2008). En el mismo sentido, la sobre-expresión de *Irx5* en el mismo tipo celular provoca una reducción en la expresión de p21 (Myrthue y cols., 2008). Estos datos parecen no correlacionar con los publicados recientemente por Ha Nguyen y cols. (2012) en los que *Irx4* en el mismo tipo de cáncer parece actuar como supresor de tumores.

Ante los datos publicados hasta el momento, los genes *Irx* parecen intervenir en el desarrollo de diversos tipos de tumores pero dependiendo del tipo celular y del gen *Irx* (*Irx1*-6) actuarían como supresores de tumores o como oncogenes. Salvo en el caso mencionado (Myrthue y cols., 2008) en el que se han relacionado cambios en la expresión de p21 con la actividad de un gen *Irx* no se conocen los mecanismos moleculares por los que las proteínas *Irx* intervienen en el progreso del cáncer. Ya que estos genes se encuentran conservados a lo largo de la evolución, un análisis de su función en *D. melanogaster* podría ayudar a descifrar estos mecanismos.

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se ha centrado en analizar los mecanismos moleculares por los que los genes del complejo *Iroquois* intervienen en el control de la proliferación celular y en la formación del patrón de venas y en establecer cómo se regula su estabilidad y su actividad por las vías de señalización del EGFR y Dpp. Para ello hemos utilizado como modelo los discos imaginales de ala y ojo de *D. melanogaster* con los siguientes objetivos parciales:

1. **Analizar el papel de los genes del C-*Iro* en el control del ciclo celular en condiciones silvestres y en modelos tumorales.**
2. **Profundizar en el papel de *caup* en la especificación de las venas.**
3. **Definir las vías de señalización que colaboran con *Caup* en la especificación de venas.**
4. **Estudiar una posible regulación postraducciona de *Caup* mediante fosforilación dependiente de MAPK y el papel biológico de esta modificación.**
5. **Identificar las MAPK con capacidad de fosforilar a las proteínas *Iro*.**
6. **Obtención de proteínas *Iro* mutantes en posibles sitios de fosforilación por MAPK para el análisis de su funcionalidad.**

RESULTADOS

1. FUNCIÓN DE *CAUP* EN PROLIFERACIÓN CELULAR.

Como hemos mencionado en la Introducción, Gómez-Skarmeta y cols. (1996) describieron que la sobre-expresión de *ara* en el disco imaginal de ala con la línea C765 Gal4 afectaba al desarrollo de este apéndice. Las alas adultas resultantes mostraban tejido de venas extra y fusión de las venas L2-L3 y L4-L5, además de una fuerte reducción en el tamaño (Figura I13. I). Comprobamos que la expresión del transgén *caup*·HA (generado en esta Tesis, ver Materiales y Métodos) con la misma línea C765 reproduce el fenotipo descrito por Gómez-Skarmeta y cols. (1996) aunque notablemente más suave (Figura R1. B). Observamos una reducción de la distancia entre las venas L4 y L5, la desaparición de la vena L2, algunos fragmentos de venas extra y la pérdida de tejido en el ala adulta.

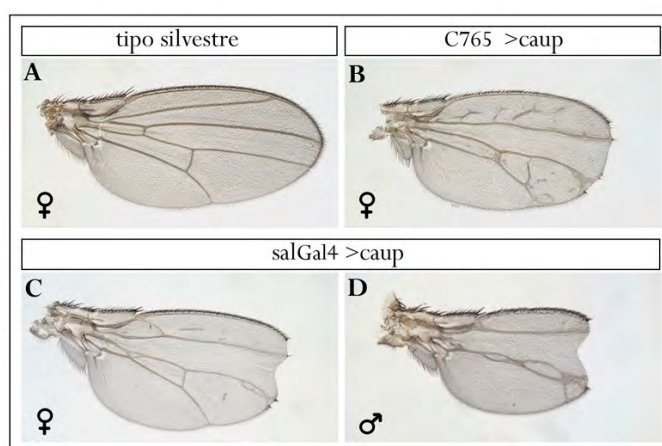


Figura R1. Fenotipos causados por la sobre-expresión de *caup* en el territorio de ala. La sobre-expresión se llevó a cabo a 25 °C.

La sobre-expresión de *caup*·HA con la línea *salGal4* también reproduce el fenotipo descrito anteriormente siendo más suave en hembras que en machos (Figura R1. C, D). Conviene especificar que en adelante los fenotipos de ala adulta mostrados en esta Tesis se refieren exclusivamente a los observados en hembras.

1.1. La activación de la vía Dpp no rescata el fenotipo de sobre-expresión de *caup*.

El fenotipo causado por la sobre-expresión de *caup* es muy similar al provocado por algunos alelos de *dpp* (Adachi-Yamada y cols., 1999a). Analizamos la actividad de la vía de Dpp en discos imaginales de ala de larva III en los que expresamos *caup* durante 12 h a 29°C con la línea *apGal4; tubGal80^{ts}* (Figura R2). En estos discos observamos que las células que expresan ectópicamente *Caup* tienen menores niveles de pMad y Sal (transductor y gen diana de la vía respectivamente, de Celis y cols., 1996a; Inoue y cols., 1998; Lecuit y cols., 1996; Sekelsky y cols., 1995; Tanimoto y cols., 2000) que las células control (Figura R2). A pesar de la disminución en la intensidad de la señal de Sal, el tamaño del dominio donde se activa su expresión no parece afectado, sugiriendo que la difusión del morfógeno Dpp no está alterada (Figura R2. B-B').

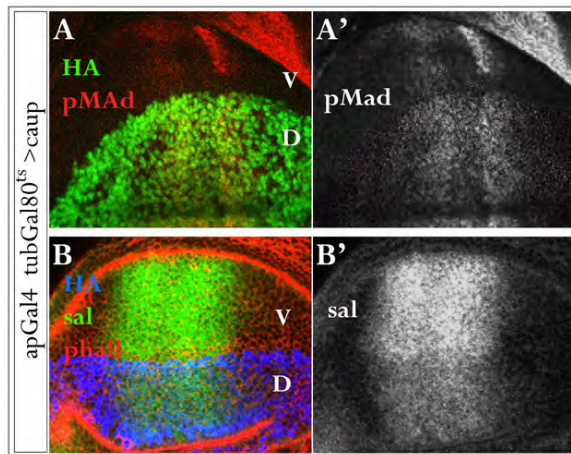


Figura R2. Actividad de la vía de Dpp en el disco de ala en condiciones de sobre-expresión de *caup*. (A, A') Acumulación de pMad. (B, B') Expresión de Sal. La tinción con anti-HA marca las células que expresan *caup* en el compartimento dorsal controlada por *apGal4* (D). La expresión de pMad y Sal en el compartimento ventral (V) se tomó como control. Se mantuvieron las larvas *apGal4, tub-Gal80^{ts}/UAS-caup·HA* a 17 °C hasta el comienzo del tercer estadio larvario. En este momento se pasaron a 29 °C, disecándolas 16h después. En esta figura y en las siguientes los discos de ala se muestran con el compartimento V arriba y el P a la izquierda.

Si el fenotipo de falta de tejido alar y/o alteración del patrón de venas provocado por la sobre-expresión de *caup* se debiera a una bajada en la señalización por Dpp, esperaríamos verlo atenuado por activación ectópica de la vía. Sin embargo, cuando utilizamos la línea *salGal4* para dirigir la expresión de Caup junto a *Mad*, *Tkv⁺* (receptor de Dpp, Brummel y cols., 1994; Nellen y cols., 1994; Penton y cols., 1994) o *Tkv^{QD}* (proteína Tkv mutante constitutivamente activa, Nellen y cols., 1996) no observamos la recuperación ni del patrón de venas ni del tamaño del ala e incluso, en algunos casos se observa un fenotipo más acusado (Figura R3. F-H).

A la vista de estos resultados, no podemos atribuir el fenotipo causado por la expresión ectópica de *caup* en el ala a la disminución en la señalización de la vía de Dpp.

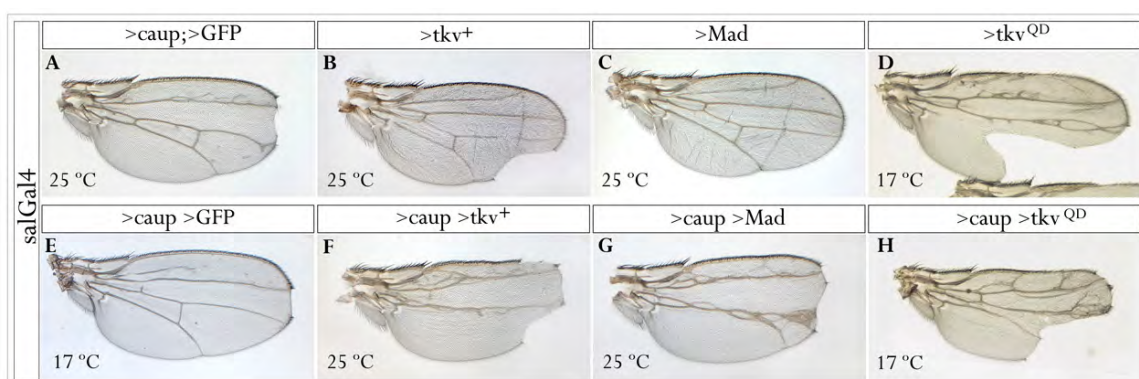


Figura R3. La activación de la vía de Dpp no recupera el fenotipo provocado por la sobre-expresión de *caup*. Alas adultas representativas de los fenotipos mutantes causados por la sobre-expresión conjunta de *caup* y diferentes componentes de la vía de Dpp (F-H) y de cada uno de ellos independientemente (A-E). (En la esquina inferior izquierda se indica la temperatura a la que se llevaron a cabo las sobre-expresiones).

1.2. La apoptosis inducida por la sobre-expresión de *caup* no justifica la pérdida de tejido.

A continuación nos planteamos la posibilidad de que el fenotipo causado por la expresión ectópica de *Caup* se debiera a muerte celular. Durante el desarrollo larvario en los discos imaginales de ala de moscas silvestres se detectan escasas células apoptóticas (Milan y cols., 1997b) (Figura R4. A-A'). Sin embargo, en los discos que expresan ectópicamente *caup* dirigido por *salGal4* detectamos un elevado número de células en apoptosis (Figura R4. B-b').

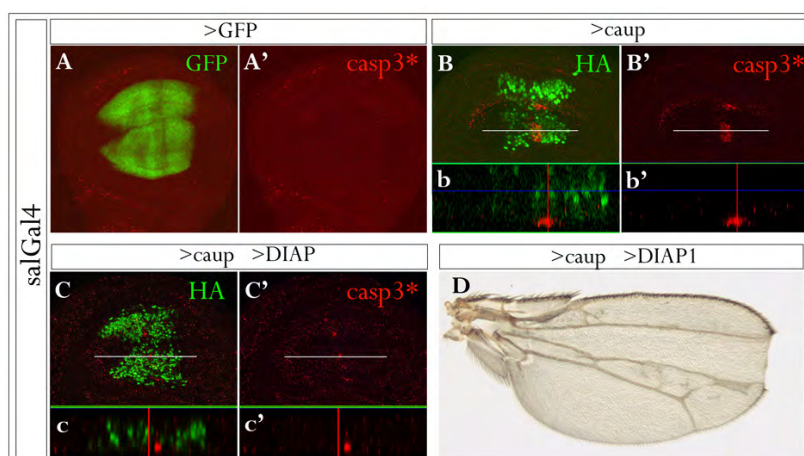


Figura R4. La apoptosis no contribuye sustancialmente a la falta de tejido asociada a la sobre-expresión de *caup*. Comparación de los patrones de células apoptóticas (determinado por tinción con anti-Casp3 activada) en discos de larvas control (A, A'), que sobre-expresan *caup*·HA (B, B') o que co-expresan *caup*·HA y DIAP1 en el dominio *sal* (C, C'). (b, b', c, c') Cortes sagitales al nivel del disco de ala indicado por las líneas blancas. (D) La interferencia con la apoptosis mediante sobre-expresión de DIAP1 no modifica el fenotipo en ala adulta causado por la sobre-expresión de *caup* (compárese con Figura R3. A).

Con el fin de inhibir la muerte celular asociada a la sobre-expresión de *caup*, expresamos este gen conjuntamente con la proteína de *Drosophila* IAP1 (DIAP1), un inhibidor de las caspasas (Wang y cols., 1999) o la proteína antiapoptótica de baculovirus p35 (Hay y cols., 1994). Como mostramos en la Figura R4.D, la coexpresión de DIAP1 y *caup*, aunque eliminó casi por completo la apoptosis (Figura R4.C, c') produjo un fenotipo similar al causado por la sobre-expresión de sólo *caup* (Figura R4. D). La inhibición de la apoptosis mediante la expresión de p35 tampoco modificó el fenotipo adulto producido por la sobre-expresión de *caup* (no mostrado).

Por tanto, a pesar de que algunas de las células que expresan ectópicamente *caup* entran en apoptosis, estos resultados apuntan a que ni la pérdida de tejido ni la modificación del patrón de venas se deben a muerte celular.

1.3. La sobre-expresión de los genes *Iro* interfiere con el progreso del ciclo celular.

Así mismo, nos preguntamos si el fenotipo causado por la sobre-expresión de *caup* podría deberse a una disminución de la proliferación celular.

Para determinar si *Caup* interfiere con el ciclo celular, indujimos su expresión en LIII durante 16h a 29°C en los compartimentos dorsal o posterior bajo el control de *apGal4* o *hhGal4* en combinación con *tubGal80^{ts}* (Figura R5.C-D”) y analizamos el patrón de células en fase de Mitosis (M). En estos discos, en los territorios que sobre-expresan *Caup* disminuye notablemente el número de células en fase M (flechas en Figuras R5. C” y D”) y lo que lleva a una reducción del tamaño de estos territorios (puntas de flecha en Figuras R5. C” y D”).

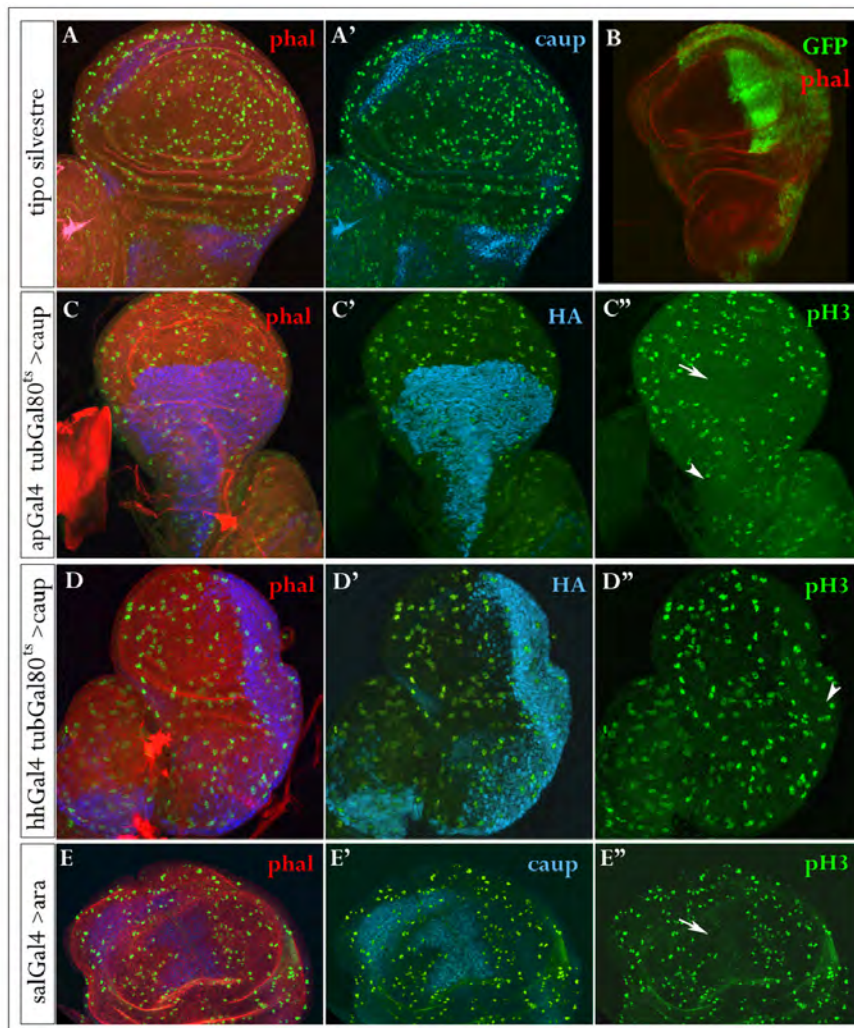


Figura R5. La sobreexpresión de los genes *Iro* interfiere con la proliferación celular.

Distribución de células en Mitosis, detectada por tinción con anti-pH3 (en verde), en discos imaginales de ala de tipo silvestre (A-A') o que expresan ectópicamente diferentes componentes del *C-Iro* (C-E"). La expresión de los genes del *C-Iro* se detecta por tinción con anti-HA o anti-*caup* (en azul) y los contornos celulares se marcan con faloidina (en rojo). Nótese el reducido tamaño del compartimento P en D-D" asociado a la expresión de *caup* bajo el control de *hhGal4* comparado con el tamaño normal del compartimento P en un disco *enGal4* UAS-GFP (B). Se mantuvieron

las larvas *apGal4* (o *hhGal4*) *tubGal80^{ts}*/UAS-*caup*·HA a 17 °C hasta el comienzo del tercer estadio larvario. En este momento se pasaron a 29°C, disecándolas 16h después. la sobre-expresión con *salGal4* se llevó a cabo a 25 °C.

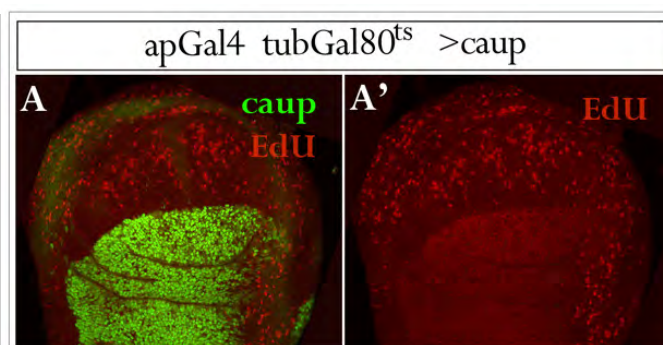
Dada la redundancia funcional demostrada entre los componentes del *C-Iro* para diferentes actividades de estas proteínas (Carrasco-Rando y cols., 2011; Cavodeassi y cols., 2000; Diez del Corral y cols., 1999; Gomez-Skarmeta y cols., 1996; Yang y cols., 1999) nos preguntamos si *ara* y *mirr* también podrían interferir con el ciclo celular en las células de los discos imaginales de ala. Utilizamos *salGal4* para dirigir la expresión de *ara* (Figura

R5. E-E”) o *mirr* (no mostrado) en la región central del ala. De forma similar al fenotipo causado por la sobre-expresión de *caup*, las células que expresan ectópicamente *ara* o *mirr* ven disminuida su proliferación.

Con el fin de corroborar que las células que sobre-expresan *caup* se encuentran detenidas en la progresión del ciclo celular analizamos la incorporación del análogo de timidina EdU (Salic y Mitchison, 2008) para marcar las células en fase de Síntesis (fase S). Como se observa en la Figura R6 las células en las que se expresó *caup* durante 12 h a 29 °C (controlado por *apGal4*; *tubGal80^{ts}*) no incorporan EdU.

Figura R6. La sobre-expresión de *caup* interfiere con la entrada en fase S. Distribución de células en fase S, detectada por incorporación de EdU (en rojo), en discos imaginales de ala que expresan ectópicamente *caup* (verde) en el compartimento D (A-A’). Se mantuvieron las larvas

*apGal4 tubGal80^{ts}/UAS-*caup*·HA* a 17 °C hasta el comienzo del tercer estadio larvario. En este momento se pasaron a 29 °C, disecándolas 16h después.



En conjunto, estas observaciones indican que la sobre-expresión de *caup* interfiere con el avance del ciclo celular, y sugieren que la disminución en el número de células del disco de ala por una bajada de la tasa de proliferación es la causa de la falta de tejido en el ala adulta.

1.4. La sobre-expresión de *CycE* suprime la interrupción de la proliferación causada por *caup*.

Nos preguntamos si la sobre-expresión de *Caup* interfería con el avance del ciclo celular actuando sobre alguna fase concreta del ciclo. Para ello, sobre-expresamos *caup* en combinación con diferentes genes que codifican proteínas involucradas en el control de fases específicas del ciclo celular, o bien en fondos mutantes heterocigóticos para los mismos (Figura R7).

En primer lugar, expresamos de forma conjunta *caup* y uno de los reguladores específicos del paso G1-S, *Cyclin E* (*CycE*, revisado en Moroy y Geisen, 2004) o G2-M *string* (*stg*, Edgar and O’Farrell, 1989). Llamativamente, la expresión conjunta de *caup* y *CycE* revierte el fenotipo en el ala adulta obteniéndose un patrón de venas y un tamaño de ala similar al de tipo silvestre (Figura R7. B). Por el contrario, la de *stg* no ayuda a recuperar ni el patrón de venas ni el tamaño del ala (Figura R7. K).

Estos resultados sugerían que las células que sobre-expresan *caup* podían estar detenidas en el paso G1-S por una bajada del nivel y/o de la actividad de CycE. Para comprobar esta hipótesis analizamos el efecto de reducir a la mitad la cantidad de CycE en discos que sobre-expresan *caup*. Como se observa en la Figura R7. J, la heterocigosis para un alelo hipomorfo de *CycE* incrementa el fenotipo mutante en ala asociado a la sobre-expresión de *caup*.

La CycE se une y activa a la quinasa Cdk2 (Cdc2c en *Drosophila*) que por fosforilación inicia una cascada de eventos que llevan a la expresión de genes específicos de la fase S (Knoblich y cols., 1994; Sauer y cols., 1995). En el caso de coexpresar *cdc2c* junto con *caup* no apreciamos ninguna modificación en el ala adulta (Figura R7. D) con respecto a la expresión exclusivamente de *caup*. Sin embargo, el fenotipo se agrava si expresamos *caup* en un fondo heterocigótico para *cdc2c* (Figura R7. I).

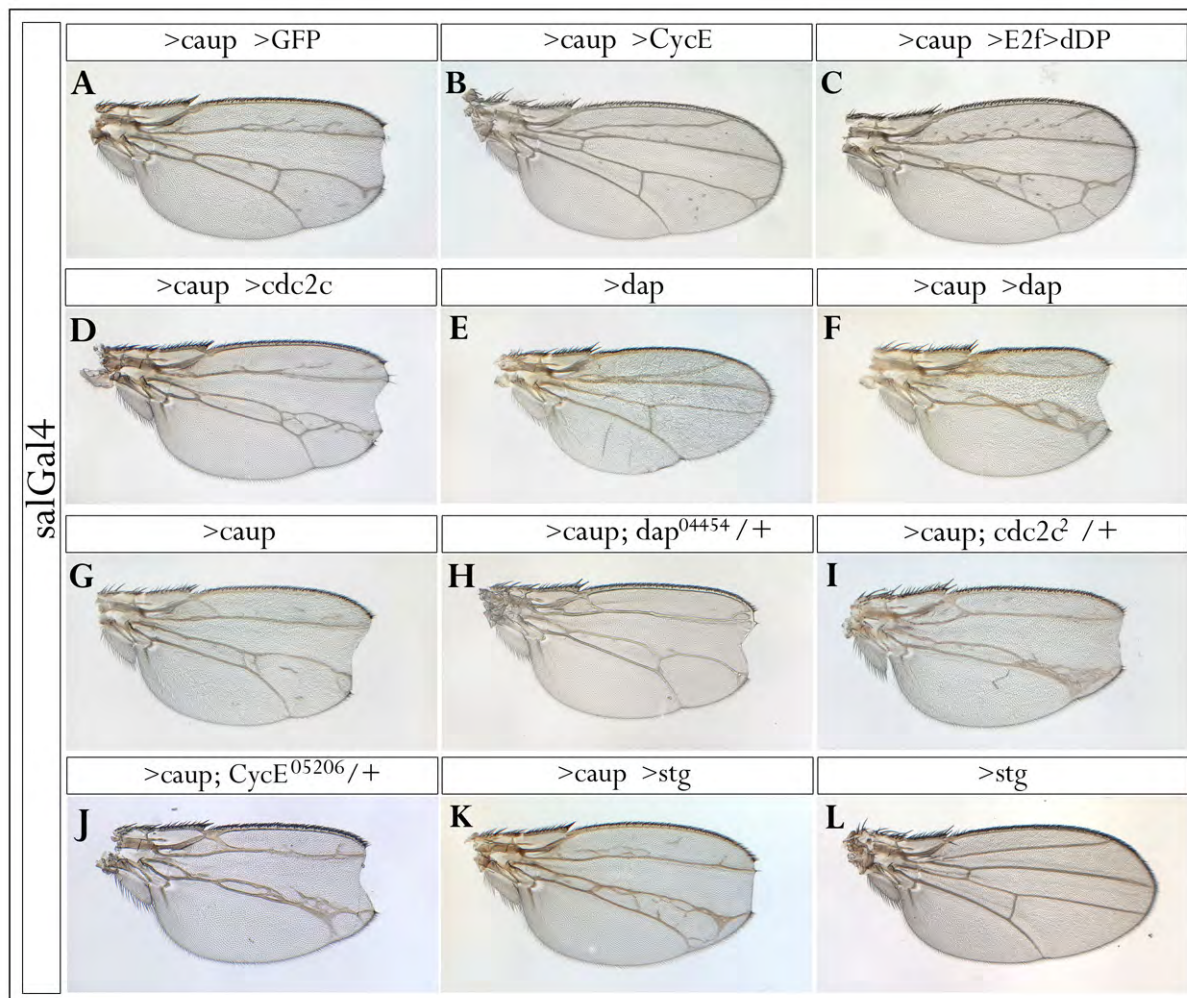


Figura R7. Alas adultas representativas de los fenotipos obtenidos de la interacción de *caup* con diferentes componentes de ciclo celular. Nótese que el fenotipo de sobre-expresión de *caup* (A) se rescata mediante expresión conjunta con *CycE* (B) o *E2f/dDP* (C) y es más acusado sobre un fondo mutante heterocigótico para *CycE* (J) o *cdc2c* (I). Las sobre-expresiones se realizaron a 25 °C.

Consistente con un efecto de *Caup* sobre el control del ciclo celular a nivel de cambios en la actividad del complejo *CycE/Cdk2*, la coexpresión de *caup* y *dacapo* (*dap*, ortólogo de p21, proteína inhibidora de la actividad del complejo *CycE/Cdk2* en vertebrados; Lane y cols., 1996) mediante *salGal4* incrementa el fenotipo mutante del ala pues se fusionan completamente las venas L4 y L5 y el ala es más pequeña que cuando sobre-expresamos únicamente *caup* (comparar las Figuras R7. A y F). Sin embargo, la expresión de *caup* en fondo mutante heterocigótico para *dap* no modifica apreciablemente el fenotipo adulto (Figura R7. H).

El complejo E2f/dDP es necesario para la transcripción de *CycE* en el disco de ala, y su sobre-expresión activa la expresión de *CycE* (Neufeld y cols., 1998). Al analizar la interacción en condiciones de sobre-expresión de *caup* y *e2f/dDP* encontramos un rescate fenotípico equivalente, aunque en menor grado, al obtenido al co-expresar *caup* y *CycE* (Figura R7. C).

Para confirmar que una sobre-expresión de *CycE* antagoniza el efecto de *caup* sobre la proliferación utilizamos anti-pH3 para marcar células en división en los discos imaginales de ala de LIII. Tal como hemos mostrado anteriormente, las células que expresan *caup* bajo el control de *salGal4* ven fuertemente disminuída su división (Figura R8. A-A'), pero la expresión conjunta de *caup* y *CycE* (Figura R8. B-B') permite que estas células presenten un patrón de división similar al de tipo silvestre (Figura R5. A-A').

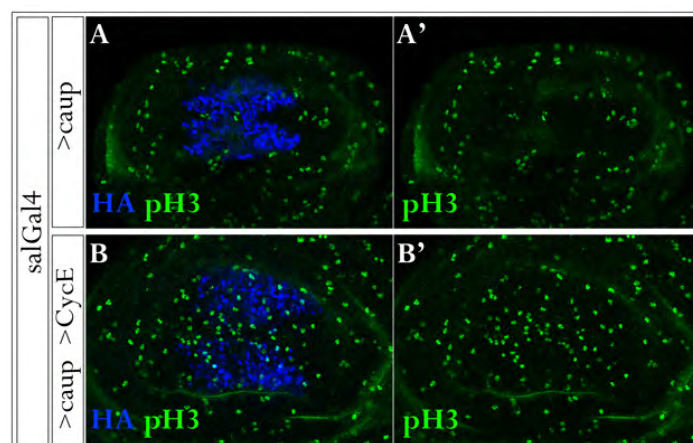


Figura R8. *CycE* antagoniza el efecto de la sobre-expresión de *caup* sobre la proliferación celular. División celular, detectada con anti-pH3 (verde), en discos imaginales de ala que expresan ectópicamente *caup* (A-A') y *caup* y *CycE* (B-B') en el dominio de *sal* (azul).

1.5. Los mutantes *iro* muestran un aumento de la proliferación celular.

Nuestros resultados indican que la sobre-expresión de *caup* induce la parada del ciclo celular. Como estos datos se obtuvieron en condiciones de sobre-expresión de *caup* existía la posibilidad de que los altos niveles de *Caup* que proporciona el sistema Gal4-UAS ejercieran unos efectos no fisiológicos sobre el ciclo celular. Sin embargo, estudios previos basados en condiciones de falta de función de los genes *Iro* (González-Pérez, 2009; Pichaud y Casares, 2000) sugerían un papel de los mismos como represores de la proliferación de las células

del compartimento dorsal del ojo. Así, la región dorsal de los ojos adultos de las moscas mutantes *iro*^{EGP1} es de mayor tamaño que en el tipo silvestre (Figura I13. B) aumentando la penetrancia de fenotipo en la combinación *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1} (González-Pérez, 2009).

Por tanto, con el fin de estudiar si *Iro* tiene un papel en la progresión del ciclo celular en condiciones fisiológicas, analizamos la proliferación en discos imaginales mutantes para el C-*Iro*. Comparamos el número de células en Mitosis en territorios en los que se expresan los genes del C-*Iro* durante el desarrollo larvario (la región presuntiva de notum del disco imaginal de ala y la región dorsal del disco imaginal de ojo) de larvas de genotipo silvestre (Figura R9. A y C) y de larvas mutantes *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1} (Figura R9. B y D). En la Figura R9. E, se muestra la tasa de proliferación en estos territorios en discos silvestres y mutantes *iro* observándose en ambos territorios diferencias significativas ($p > 0,005$). En el compartimento dorsal del ojo la tasa de proliferación en los discos *iro* es un 37% mayor que en discos de tipo silvestre, mientras que en el territorio de notum la diferencia aumenta hasta un 64%.

Así pues, en analogía con los experimentos de sobre-expresión, los datos de falta de función apuntan a que las proteínas *Iro* tienen una capacidad represora de la proliferación.

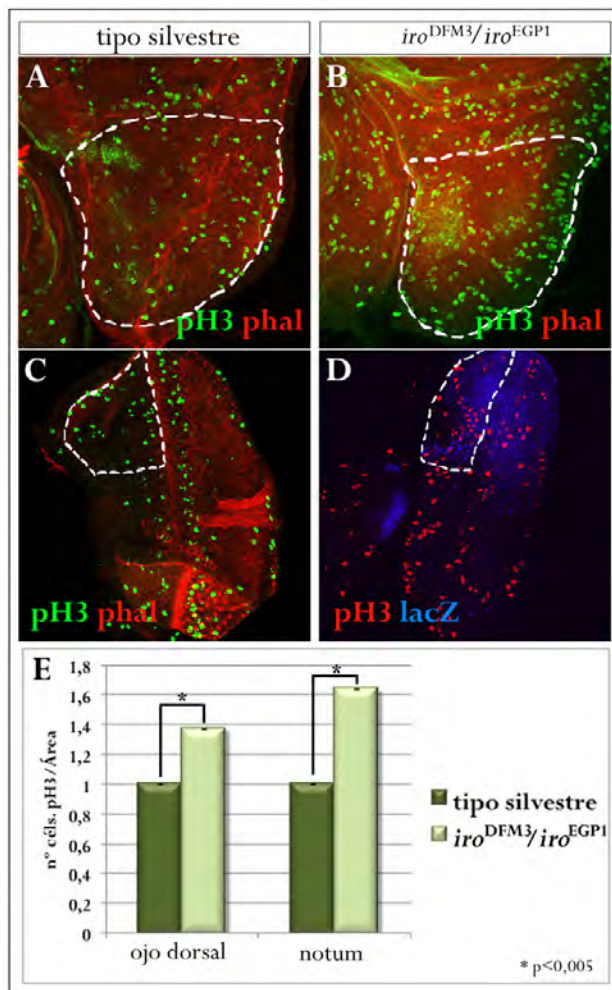


Figura R9. Los territorios de notum y ojo dorsal mutantes *iro* presentan mayor tasa de proliferación. (A-D) Células en división, detectadas con anti-pH3, en discos imaginales de tipo silvestre (A y C) y mutantes *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1} (B y D) (Estas mutaciones se describen en la Figura I9). (E) Tasa de proliferación, medida en número de células en fase M/área (indicada por la línea punteada) en ojo dorsal y notum de discos imaginales de tipo silvestre (verde oscuro) y mutante *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1} (verde claro). (Muestra, n = 10 discos para cada genotipo).

1.6. En los mutantes *iro*⁻ disminuye la población de células en G1.

Para caracterizar el efecto de la insuficiencia de proteínas Iro en la progresión a través de cada una de las fases del ciclo, realizamos un análisis de FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Disociamos las células de discos de ala de larvas de tercer estadio de dos condiciones mutantes para C-Iro: *iroGal4 UAS-GFP/+* e *iroGal4 UAS-GFP/iro^{DFM3}*. La expresión de GFP bajo el control de *iroGal4* marca dos poblaciones de células: la muestra GFP⁺ corresponde a las células del dominio Iro que son mutantes *iro* hipomorfos y la muestra GFP⁻ es el control interno (células que no expresan *iro* durante el desarrollo).

Como era esperable, las células GFP⁻ (células control) de cada condición mutante muestran unos perfiles de ciclo celular similares (37-38 % en fase G1, 20-21% en fase S y 40-43 % en fase G2; Figura R10. B-C, barras verde claro).

Por otra parte, las células GFP⁺ de los dos genotipos mutantes hipomorfos *iroGal4/+* e *iroGal4/iro^{DFM3}* presentan un perfil de ciclo celular semejante entre sí y diferente del de las células control (Figura R10. B y C). En estas células hay una disminución significativa ($p > 0,005$) en la fracción en fase G1 (27% en *iroGal4/+* y 28% en *iroGal4/iro^{DFM3}*) comparada con las células de tipo silvestre (37%). Estudios previos han demostrado que las células de los discos imaginales de ala compensan un acortamiento en G1 o G2 elongando las otras fases (Neufeld y cols. , 1998). En nuestro caso, la disminución en la fracción de células en fase G1 parece compensarse con un aumento en la fracción celular en fase S (23% y 25% para *iroGal4/+* e *iroGal4/iro^{DFM3}* respectivamente, comparado con 20-21% en las células de tipo silvestre) y G2 (50% y 47% para *iroGal4/+* e *iroGal4/iro^{DFM3}* respectivamente, comparado con 40-43% en las células de tipo silvestre) (Figura R10. B-C, barras verde oscuro).

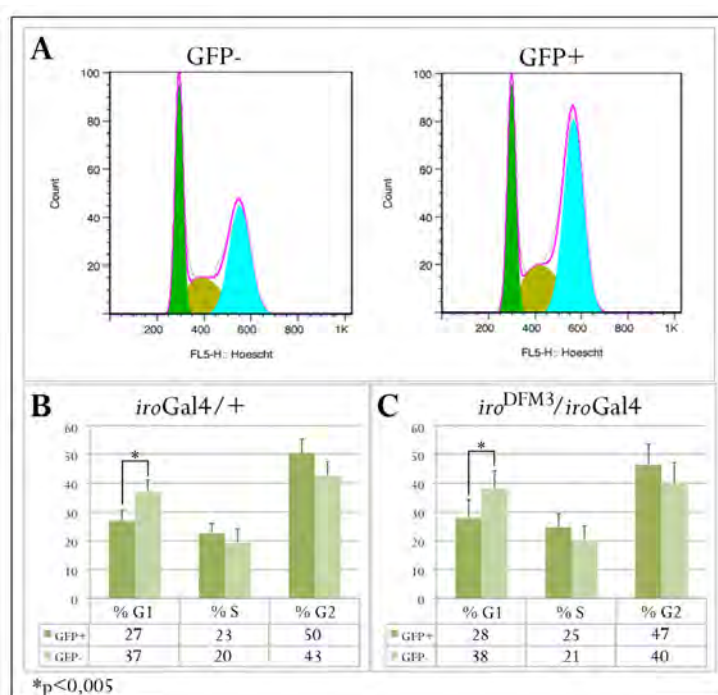


Figura R10. Los genes *Iro* controlan la progresión del ciclo celular. Resultados de FACS realizados en discos imaginales de ala. (A) Perfiles de ciclo celular representativos elaborados a partir del contenido en ADN para células de tipo silvestre (GFP⁻) y células mutantes *iro* (GFP⁺). (B-C) Representación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en discos de ala de mutantes *iroGal4 UAS-GFP/+* (B) e *iro^{DFM3}/iroGal4 UAS-GFP* (C) para cada una de las fracciones GFP⁻ (verde claro) y GFP⁺ (verde oscuro). Cada experimento se realizó al menos 7 veces.

A la vista de estos resultados podemos concluir que una reducción en los niveles de proteínas Iro causa un acortamiento de la fase G1, y como consecuencia las células se acumulan en las fases S y G2. Estos resultados se correlacionan con que en discos *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1} se encuentren más células en M que en los discos de tipo silvestre (Figura R9. B, D).

1.7. La falta de *Iro* induce muerte celular.

Estudios previos han demostrado que la desregulación del ciclo celular en los discos imaginales promueve la muerte celular (Asano y cols., 1996; Du y cols., 1996). Ya hemos indicado más arriba que en condiciones de sobre-expresión de *caup*, en las que las células cesan de proliferar, se induce apoptosis (Figura R4). Dado que los mutantes *iro* tienen acelerado el paso por la fase G1, quisimos analizar si en estas células, en las que el ciclo celular también está desregulado, se inducía apoptosis. Como mostramos en la Figura R11. A y C, en los discos de ala mutantes *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1} aparecen más células que acumulan caspasa3 activada que en los discos de tipo silvestre, principalmente en la región presuntiva de notum. Hay que destacar que el notum es la zona donde se expresan mayoritariamente los genes *iro* y donde se detectaba un mayor exceso de proliferación en condiciones mutantes (Figura R9).

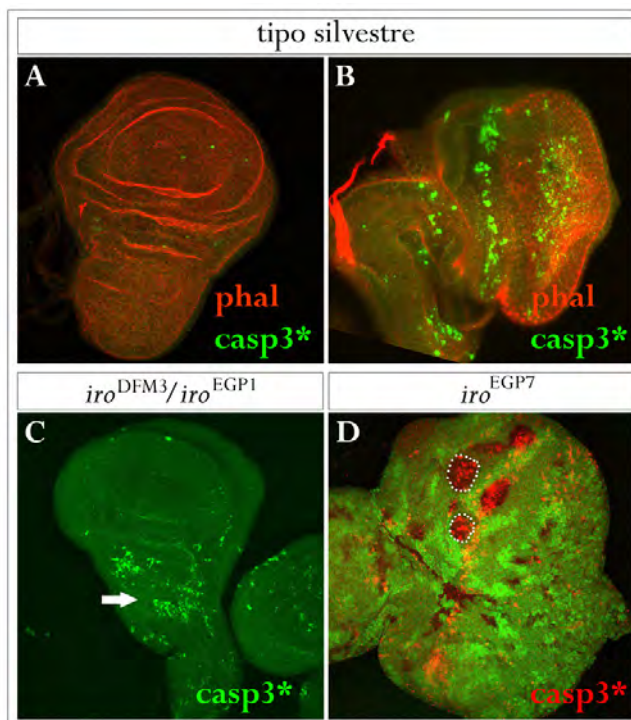


Figura R11. Apoptosis en las células *iro*⁻. Muerte celular detectada por tinción con anti-casp3* (verde) en discos imaginales de tipo silvestre de ala (A) y ojo (B), teñidos también con faloidina (rojo). (C) Tinción con anti-casp3* en discos de ala mutantes *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1}. (D) Tinción con anti-casp3* (rojo) en disco un imaginal en el que hemos inducido clones *iro*^{EGP7} (marcados por falta de GFP).

En el caso de los discos imaginales de ojo, los de tipo silvestre presentan un elevado número de células apoptóticas, lo que dificulta el analizar si cambia el patrón de muerte celular en discos mutantes *iro*^{DFM3}/*iro*^{EGP1}. Para abordar este problema, generamos clones

de falta de función *iro*^{EGP7} (una deficiencia que elimina todos los genes del C-*Iro*, Figura I9). Como se observa Figura R11. D, una fracción muy alta de las células mutantes entra en apoptosis.

Concluimos que la falta de función de los genes del C-*Iro* causa apoptosis de forma autónoma celular.

1.8. Regulación por *Caup* de la actividad del complejo *CycE*/*Cdk2*.

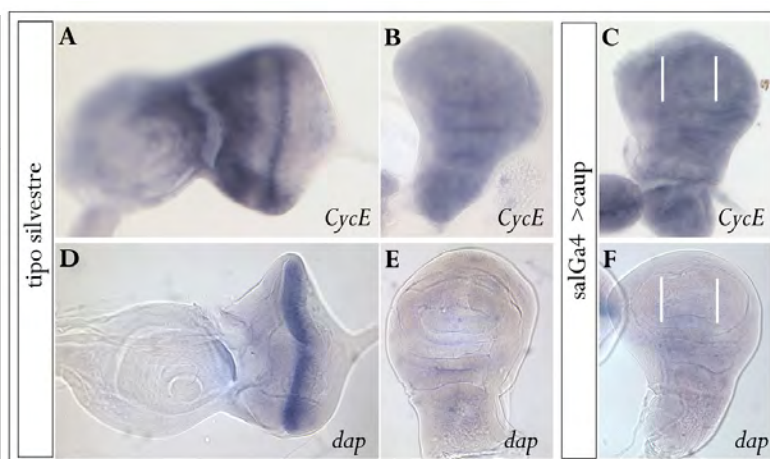
***Caup* no modifica la transcripción de *cycE* o *dap*.**

Hemos mostrado anteriormente que el fenotipo de sobre-expresión de *caup* se recuperaba en condiciones de co-expresión con UAS-*CycE* (Figura R7. B). Este dato, junto con el hecho de que *Caup* sea un factor de transcripción, sugería una posible disminución en la transcripción de *CycE* endógena debido a los altos niveles de *Caup*, que no afectarían a la expresión del transgén UAS-*CycE*. Con el fin de determinar si *Caup* controla la transición G1/S reprimiendo la transcripción de *CycE*, examinamos la expresión de *CycE* en discos de ala que expresaban ectópicamente *caup* bajo el control de *salGal4*. Como se muestra en la Figura R12. B, *CycE* se expresa de forma homogénea en el disco de ala de individuos de tipo silvestre, expresión que no vemos alterada al sobre-expresar *caup* (Figura R12. C).

La regulación de la actividad del complejo *CycE*/*Cdk2* está mediada también por el CKI *dap* (de Nooij y cols. , 1996). Aunque no teníamos evidencias de que la parada del ciclo celular causado por la sobre-expresión de *caup* se atenuara sobre un fondo mutante *dap* (Figura R7. H), nos preguntamos si un aumento en la transcripción de *dap* causaría una disminución en la actividad del complejo *CycE*/*Cdk2* explicando así la parada en G1 observada en estas células. Sin embargo, los discos de ala en los que expresamos ectópicamente *caup* muestran un nivel de expresión de *dap* similar al de discos de tipo silvestre (Figura R12. E- F).

Figura R12. La sobre-expresión de *caup* no modifica la transcripción de *CycE* o *dap*.

Expresión de *CycE* y *dap*, detectada por hibridación *in situ*, en discos imaginales de ojo (A, D) y ala (B, C, E, F) de los genotipos indicados. Las líneas blancas (en C y F) delimitan la región de expresión de *salGal4*. La expresión en el disco de ojo sirvió de control de la calidad de las sondas.



A la vista de estos datos concluimos que la sobre-expresión de *Caup* inhibe la actividad de *CycE/Cdk2* a través de algún mecanismo diferente al de la modificación de la transcripción de *CycE* o *dap*.

La sobre-expresión de *Caup* reduce la actividad de *CycE/Cdk2*, pero no de *E2f/dDP*.

La progresión del ciclo celular desde la fase G1 a fase S requiere de una compleja regulación que incluye la actividad de los complejos *E2f/dDP* y *CycE/Cdk2* (Duronio y cols., 1995; Knoblich y cols., 1994). Previamente hemos demostrado que tanto *cycE* como *e2f/dDP* son capaces de antagonizar la parada de ciclo celular provocada por la sobre-expresión de *caup* (Figura R7. B, C). Con el fin de determinar si una disminución en la actividad de uno o ambos de los complejos *E2f/dDP* y *CycE/Cdk2* es responsable de la parada de ciclo celular asociada a la sobre-expresión de *caup*, analizamos la actividad de los mismos.

En relación a la actividad de *E2f/dDP*, analizamos la expresión de PCNA, una de sus diana transcripcionales (Yamaguchi y cols., 1995). Como se observa en la Figura R13. C-C', las células que sobre-expresan *caup* acumulan PCNA, indicando que la actividad del complejo *E2F/dDP* no está reducida.

Para examinar la actividad de *CycE/Cdk2* utilizamos en primer lugar el anticuerpo anti-*mpm2*, el cual detecta histonas fosforiladas por el complejo, resultando en una tinción nuclear punteada (Calvi y cols., 1998; Liu y cols., 2006). En la células del compartimento posterior en las que dirigimos la expresión de *caup* mediante la línea *hhGal4* durante 16 h a 29 °C observamos una señal con anti-*mpm2* menor que en las células control del territorio anterior (Figura R13. D-D'), revelando una disminución en la actividad del complejo *CycE/Cdk2*.

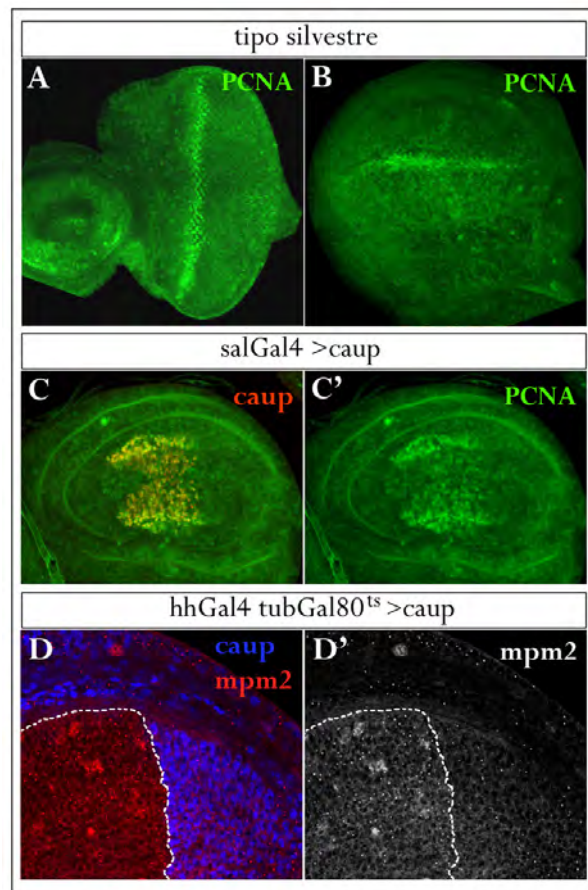


Figura R13. Ensayo de la actividad de *E2F/dDP* y *CycE/Cdk2*. (A-C') Expresión de PCNA (verde) en discos imaginales de tipo silvestre (A-B) y en discos que sobre-expresan *caup* (rojo) (C-C'). (D-D') Tinción con anti-*mpm2* (blanco en D') en discos imaginales de ala que sobre-expresan *caup* (azul) en el compartimento posterior.

Uno de los sustratos de fosforilación del complejo CycE/Cdk2 es la propia CycE. La fosforilación de CycE la marca para su degradación a través del proteosoma (Clurman y cols., 1996). Así las células mutantes *cdk2* sufren parada en G1 y acumulan CycE (Clurman y cols., 1996; Sukhanova and Du, 2008). Por tanto el nivel de CycE es un indicador de la actividad del complejo CycE-Cdk2. El análisis de los niveles de CycE en las células que sobre-expresaban *caup* reveló una acumulación de esta proteína (Figura R14. C-C') sugiriendo fallos en la degradación de CycE atribuibles a una disminución de la actividad de Cdk2.

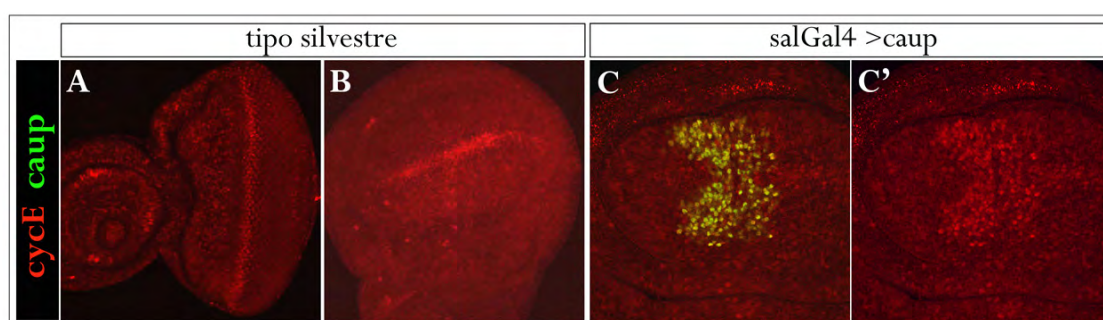


Figura R14. CycE se acumula en las células que sobre-expresan Caup. Expresión de CycE (rojo) en discos imaginales de ojo y ala de tipo silvestre (A, B) y en discos de ala que sobre-expresan *caup* (C, C').

1.9. Caup co-inmunoprecipita con CycE en células S2.

Los resultados mencionados hasta ahora indican que Caup interfiere con el paso G1 a S inhibiendo la actividad de CycE/Cdk2. El hecho de que el fenotipo causado por la sobre-expresión de *caup* no se rescate cuando co-expresamos *cdk2* (Figura R7. D), sugiere que la falta de actividad del complejo CycE/Cdk2 no se debe a una insuficiencia de Cdk2. Por el contrario, ya que que la división celular se recupera cuando expresamos conjuntamente *caup* y *CycE* (Figura R8. B-B') el nivel de CycE parece ser limitante a pesar de que se observa incluso aumentado (Figura R14. C-C'). Con estos datos nos planteamos si Caup podría secuestrar a CycE impidiendo su unión a Cdk2.

Para abordar esta cuestión analizamos la capacidad de Caup y CycE de interaccionar físicamente en células en cultivo. Transfectamos células S2 de *Drosophila* con Caup·HA e inmunoprecipitamos los lisados celulares con anticuerpos anti-HA o anti-CycE. Los Western blot muestran la presencia en los inmunoprecipitados de la proteína Caup·HA, tanto en el control (inmunoprecipitación con anti-HA) como en el caso de la inmunoprecipitación con anti-CycE (Figura R15. A). De igual forma cuando inmunoprecipitamos con anti-HA, CycE co-inmunoprecipita con Caup·HA (Figura R15. B).

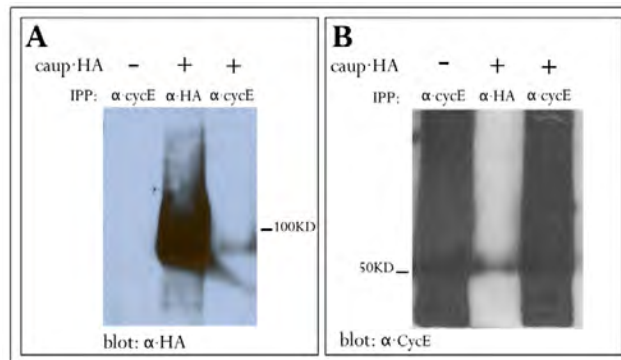


Figura R15. Caup y CycE coimmunoprecipitan en células S2. Western-blot revelados con anti-HA (A) y anti-CycE (B) de extractos de células S2 transfectadas con caup-HA e inmunoprecipitadas (IPP) con anti-CycE o anti-HA.

A la vista de estos resultados, concluimos que Caup y CycE forman parte de un complejo proteico en células S2 y nos sugiere que quizás también lo hagan en las células de los discos imaginales.

1.10. Caup se comporta como un supresor de tumores.

Los principales procesos celulares (proliferación, apoptosis, migración, etc.) y la mayoría de los genes asociados a cáncer están conservados desde *Drosophila* hasta humanos. Esto ha permitido que durante los últimos años se hayan establecido diferentes modelos de formación de tumores en *Drosophila* basados en manipulaciones genéticas definidas y reproducibles de genes supresores de tumores y oncogenes (revisado en Halder and Mills, 2011).

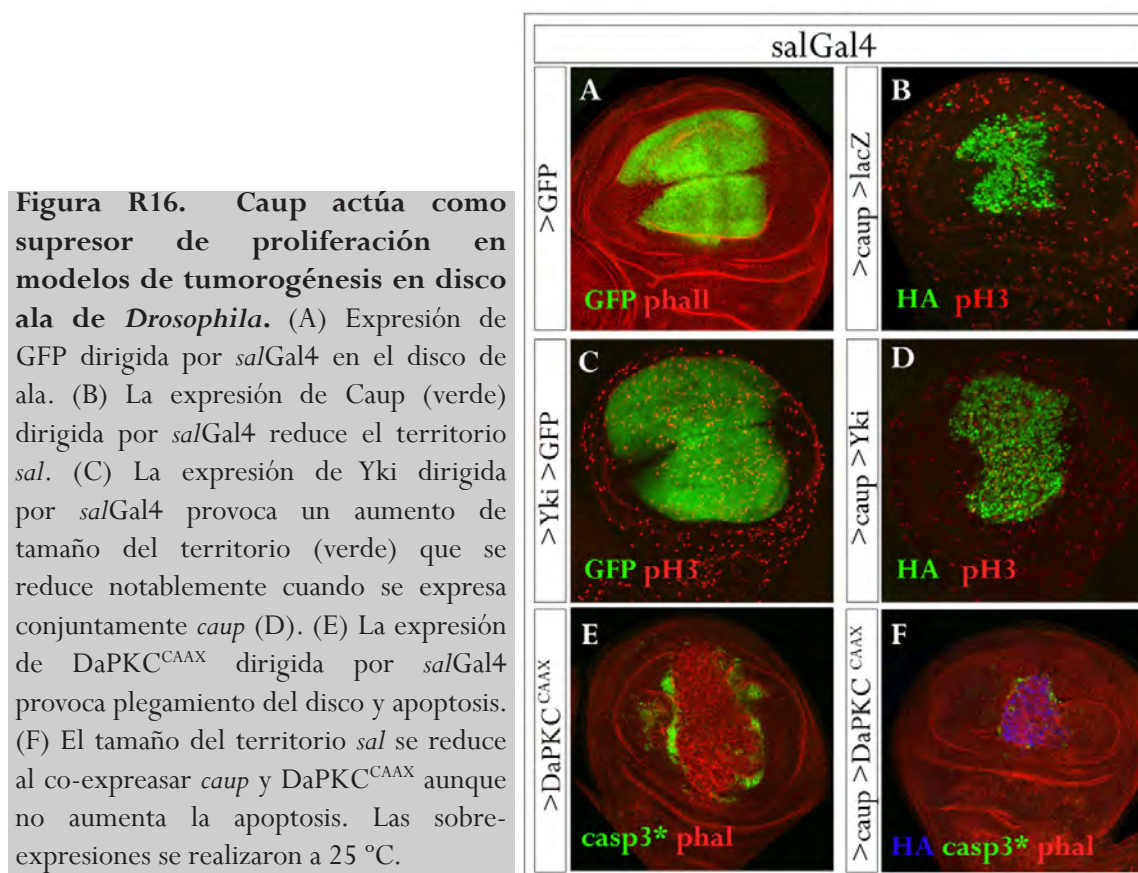
Los genes *Irx* en humanos están implicados en el desarrollo de diversos tipos de cáncer tanto como oncogenes o como supresores tumorales (Bennett y cols. , 2008 ; Bennett y cols. , 2009 ; Guo y cols., 2010 ; Lu y cols., 2005; Myrthue y cols. , 2008). En esta Tesis hemos analizado el papel de Caup en tres modelos diferentes de tumorigénesis en *Drosophila*: modelo de inhibición de la vía de Hippo, modelo de pérdida de la polaridad celular y modelo de activación de Notch y cambios epigenéticos.

Modelo tumoral de inhibición de la vía de Hippo.

La vía de señalización de Hippo controla el tamaño de los órganos mediante regulación coordinada de la proliferación y de la apoptosis (Halder and Johnson, 2011; Zhao y cols., 2010). Así, la desregulación de la vía está implicada en el desarrollo de diversos tipos de cáncer en humanos (Zhao y cols., 2007; revisado en Bao y cols., 2011). La activación de la vía de Hippo conlleva la fosforilación del activador transcripcional Yorkie (Yki) que impide su entrada al núcleo (Oh y Irvine, 2009). Entre las dianas transcripcionales de Yki se encuentran *CycE* y *dAPI1* (Tapon y cols., 2002; Wu y cols., 2003) por lo que la inhibición de la vía o la activación de Yki causan un aumento de la proliferación e inhibición de la apoptosis que contribuyen al desarrollo tumoral.

Nos preguntamos si la sobre-expresión de *caup* impediría el exceso de proliferación asociado a la falta de función de la vía de Hippo tal como lo hace sobre la proliferación endógena. Para simular una falta de función de la vía de Hippo expresamos *Yki* bajo el control de *salGal4*, lo que provoca un aumento en el tamaño de territorio *sal* (Figura R16. C, comparar con la Figura R16. A). El tamaño de este territorio disminuye cuando *caup* y *Yki* se sobre-expresan conjuntamente, y es incluso menor que el de tipo silvestre (Figura R16. A-D).

Concluir que la sobre-expresión de Caup impide el sobrecrecimiento asociado a la inhibición de la vía de Hippo.



Modelo tumoral de pérdida de la polaridad celular.

La pérdida de polaridad celular es una de las características de los carcinomas y está asociada al aumento de proliferación celular (Hanahan y Weinberg, 2011; McCaffrey y Macara, 2011). El establecimiento y mantenimiento de la polaridad ápico-basal de las células epiteliales depende de la acción conjunta de los denominados determinantes de polaridad entre los que se encuentran proteínas apicales y proteínas basolaterales (McCaffrey y Macara, 2009). La proteína quinasa aPKC, uno de los determinantes apicales, se encuentra sobre-expresada en diversos tipos de cáncer (Grifoni y cols., 2007; Murray y cols., 2010). Datos previos nuestros demuestran que la sobre-expresión de *DaPKC^{CAAX}*

(DaPKC constitutivamente activa, Sotillos y cols., 2004) en el disco de ala altera la polaridad celular y provoca el sobre-crecimiento del tejido (datos no publicados). Por ello hemos utilizado la sobre-expresión de DaPKC^{CAAX} como modelo de formación de tumores por pérdida de polaridad celular. Como se muestra en la Figura R16 E, la sobre-expresión de DaPKC^{CAAX} en el territorio de *sal* provoca un aumento en el tamaño del territorio y apoptosis. La expresión conjunta de DaPKC^{CAAX} y *caup* causa una disminución del tamaño de este territorio que no parece estar asociado a un aumento de la apoptosis (Figura R16. F).

Estos datos indican que *Caup* inhibe el sobrecrecimiento asociado a la pérdida de polaridad por sobre-expresión de aPKC^{CAAX}, actuando de nuevo como un supresor de proliferación.

Modelo tumoral de activación de Notch y cambio epigenético.

Los cambios epigenéticos, que mantienen a un gen transcripcionalmente activo o inactivo, tienen un papel fundamental en el control de la proliferación durante el desarrollo y su desregulación es una de las principales causas de la formación de tumores (Choo, 2011). Ferrés-Marco y cols. (2006) identificaron dos silenciadores epigenéticos, *Pipsqueak* (*Psq*) y *Lola*, cuya sobre-expresión en el disco imaginal de ojo junto con el ligando de Notch *Dl* inducen la formación de tumores metastásicos (Figura R17. B).

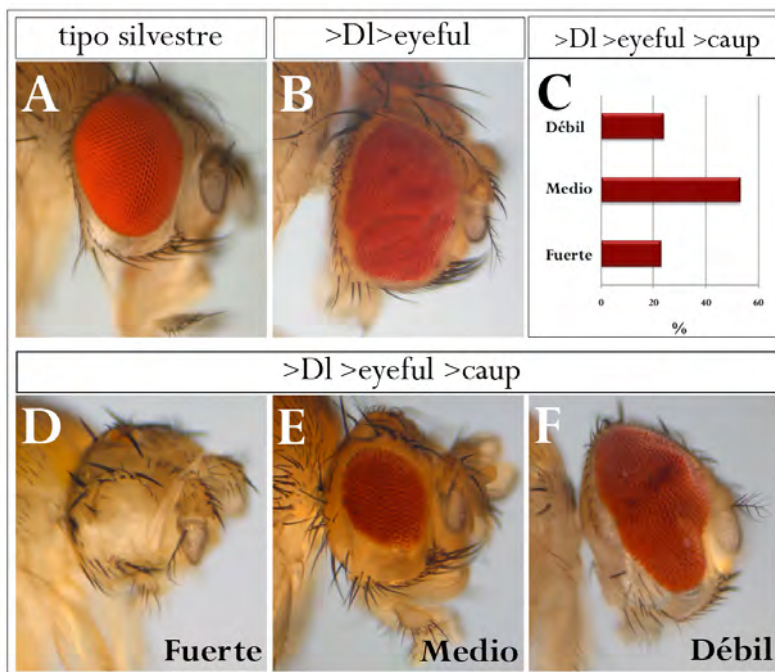


Figura R17. Caup antagoniza el crecimiento tumoral causado por la expresión conjunta de *Dl*, *lola* y *psq* (>Dl>eyeful) bajo el control de *eyGal4*. (A) Ojo adulto de tipo silvestre. (B) Ojo adulto representativo resultante de la sobre-expresión conjunta de *Dl*, *lola* y *psq*. (D-F) Fenotipos representativos de ojo adulto obtenidos de la expresión de *caup* conjuntamente con *Dl*,

lola y *psq* agrupados en tres categorías según la inhibición del crecimiento del ojo: fuerte (D), medio (E) y débil (F). (C) Cuantificación del porcentaje de ojos obtenidos para cada una de las categorías mostradas en D, E y F. La sobre-expresión se llevó a cabo a 25 °C.

Utilizamos el cromosoma recombinante *eyGal4 UAS-Dl UAS-eyeful* (en el que la línea insercional *UAS-eyeful* dirige la expresión de los genes *psk* y *lola* bajo el control de las secuencias *UAS* (Ferres-Marco y cols. , 2006), para expresar conjuntamente *caup* y analizar la función de *Caup* en un modelo tumoral del disco imaginal de ojo. Cuando se desarrollan a 25 °C, las moscas adultas *eyGal4 UAS-Dl UAS-eyeful* presentan un ojo sobrecrecido con numerosos pliegues (Figura R17. B). Sin embargo los adultos que además co-expresan *caup* muestran sobrecrecimientos menores que los de los individuos *eyGal4 UAS-Dl UAS-eyeful* en un 24% de los casos y ojos de menor tamaño que el de tipo silvestre en un 53% de los casos, llegando incluso a no desarrollarse el ojo en un 23% de los individuos (Figura R17. D-F).

El efecto de la condición de sobre-expresión *eyGal4 UAS-Dl UAS-eyeful* sobre el crecimiento es incluso más evidente en los discos imaginales (Figura R18. A, B). Los discos imaginales de LIII que sobre-expresan *caup* junto con *Dl* y *eyeful* muestran un tamaño reducido en comparación con los que sólo expresan *Dl* y *eyeful* (e incluso con los de tipo silvestre) observándose también cierta variabilidad en el fenotipo (Figura R18. C, D).

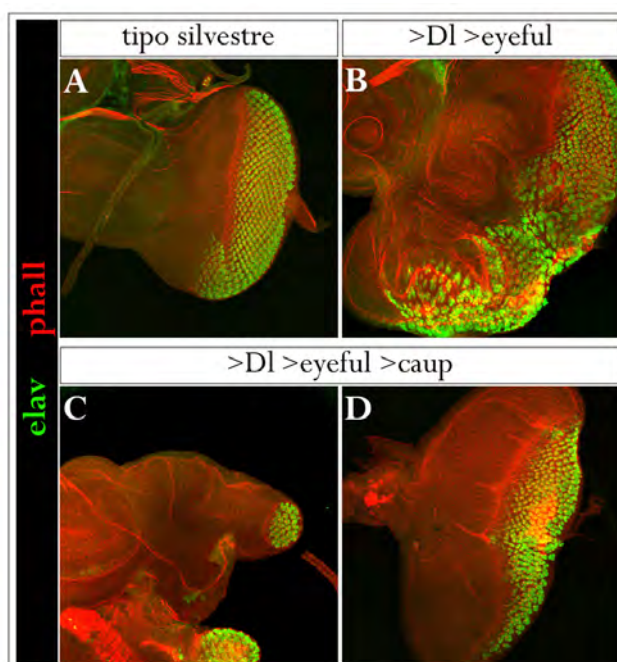


Figura R18. Efecto de la sobre-expresión de *caup* en el sobrecrecimiento del disco de ojo causado por la expresión conjunta de *Dl*, *lola* y *psq* (>*Dl*>*eyeful*) bajo el control de *eyGal4*. En todas las imágenes la proteína neuronal *Elav* marca la región posterior diferenciada (verde). (A) Disco imaginal de ojo de tipo silvestre. (B) La expresión conjunta de *Dl*, *psq* y *lola* mediante *eyGal4* causa el sobre-crecimiento del disco. (C, D) Fenotipos representativos de discos imaginales de ojo obtenidos de la expresión de *caup* conjuntamente con *Dl*, *lola* y *psq*. La sobre-expresión se llevó a cabo a 25 °C.

En conjunto, estos resultados y los obtenidos en los dos modelos tumorales anteriores indican que la sobre-expresión de *Caup* impide el crecimiento de las células tumorales. En general, se ha encontrado una asociación entre la falta de función de los genes *Iro* y el desarrollo tumoral (Bennett y cols., 2008 ; Bennett y cols., 2009 ; Guo y cols., 2010 ; Lu y cols., 2005). Por esta razón nos planteamos analizar qué efecto tendría una reducción de la actividad del *C-Iro* en un modelo tumoral. Para ello sobre-expresamos *Dl* controlada por *eyGal4* conjuntamente con un transgén que expresa ARN interferente de *mirr* (*UAS-*

mirr_i). La sobre-expresión de *Dl* no afecta de forma notable al tamaño del ojo, pero lo sensibiliza a cambios de actividad en reguladores de crecimiento (Ferres-Marco y cols., 2006). Como se observa en la Figura R19. B, la expresión conjunta de *Dl* y *mirr*-ARNi provoca el sobrecrecimiento del ojo.

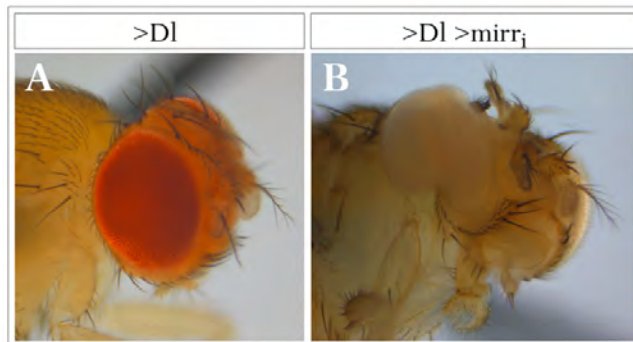


Figura R19. La insuficiencia de *mirr* provoca crecimiento tumoral en un fondo genético sensibilizado. Fenotipos representativos de ojos adultos de la combinación genética que se indica. La sobre-expresión se llevó a cabo mediante *eyGal4* a 29 °C.

En su conjunto, los resultados presentados indican que los genes del *C-Iro* actúan en *Drosophila* como genes supresores de tumores.

2. REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE CAUP DURANTE LA ESPECIFICACIÓN DE LAS VENAS.

2.1. La actividad de Erk MAPK es necesaria para la estabilidad de Caup en las provenas.

Gómez-Skarmeta y cols. (1996) demostraron que los genes *ara* y *caup* son necesarios para la expresión de *rho* en la provena L3 (Figura I13. E). De manera recíproca, la sobre-expresión de *ara* o *caup* en el disco de ala activa la expresión de *rho* (Gomez-Skarmeta y cols., 1996); Figuras I13. H y R20. C). Sin embargo, como hemos visto en el capítulo anterior, la sobre-expresión de *caup* dirigida por la línea C765·Gal4 o *sal*Gal4 sólo da lugar a la aparición de pequeños fragmentos de venas extra (Figura R1).

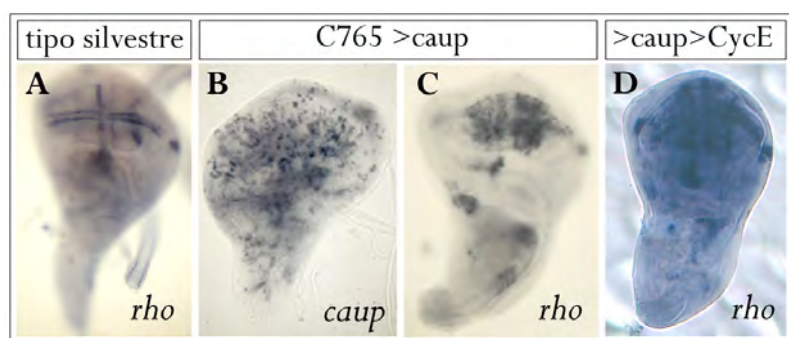


Figura R20. Caup activa la expresión de *rho* de modo restringido en el territorio de ala. Patrones de expresión de *rho* y *caup* en discos de ala de los genotipos indicados detectado por hibridación *in situ*. (B-C) La sobre-expresión generalizada de *caup* con la línea C765 (B) activa la expresión de *rho* en la región central del territorio presuntivo de ala (C). (D) La co-expresión de CycE no altera el patrón de expresión de *rho* asociado a la sobre-expresión de *caup*.

Este efecto no se debe a la parada de proliferación inducida por la sobre-expresión de *caup*, ya que ni siquiera cuando se restaura la proliferación del tejido, mediante la expresión conjunta de *caup* y *CycE*, se diferencia el territorio como vena (Figura R7. B), a pesar de que en estos discos se sigue activando la expresión de *rho* (Figura R20. D).

Analizamos, en condiciones de sobre-expresión de *caup*, la expresión de otros genes que definen los territorios presuntivos de vena. La expresión de *caup* bajo el control de *ap*Gal4; *tub*Gal80^{ts} durante 16 h a 29 °C conlleva el aumento de la expresión de *Dl* (Figura R21. B-B'). Sin embargo, no detectamos niveles de Erk di-fosforilado apreciablemente más altos de lo normal en las células que expresan *caup* dirigido por la línea *sal*Gal4 (Figura R21, D-D').

Estos datos sugieren que, aunque Caup activa la expresión *rho* y *Dl*, en las condiciones experimentales que hemos utilizado no activa la vía del EGFR a niveles suficientemente altos para la especificación de vena, o no lo hace durante un periodo de tiempo suficiente.

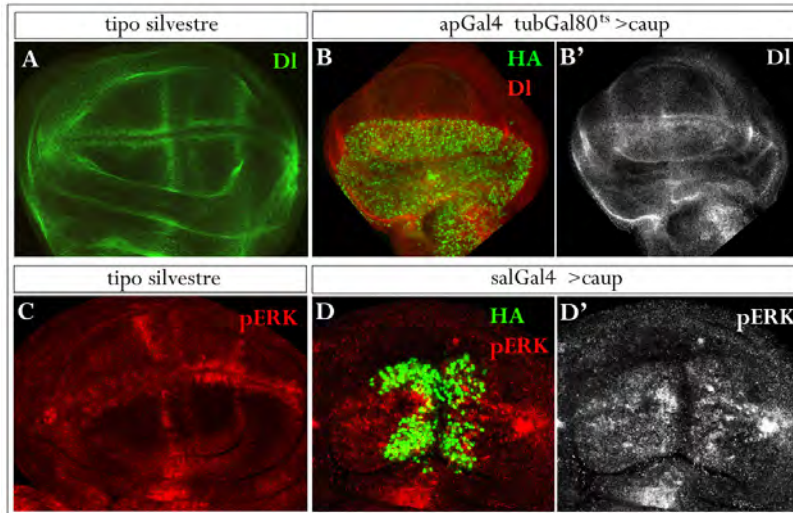


Figura R21. Efecto de la sobre-expresión de *caup* en el disco de ala sobre la expresión de marcadores de vena. Patrón de expresión de Dll (A-B') y pERK (C-D') en discos de tipo silvestre (A, C) y discos que sobre-expresan *caup* (B, B', D y D') detectado por inmunohistoquímica. La sobre-expresión de *caup* dirigida por *apGal4 tubGal80* se llevó a cabo a 29 °C durante 16 h antes de la fijación.

Para determinar si se trataba de una cuestión de niveles de activación de la vía del EGFR, utilizamos el transgén *UAS·roll^{sem}* (que expresa una forma activada de Erk, Brunner y cols., 1994) para activar de modo constitutivo esta vía. Cuando sobre-expresamos simultáneamente *caup* y *roll^{sem}* mediante *salGal4* a 17°C (condiciones en las que ni la sobre-expresión de *roll^{sem}* ni la de *caup* causan la aparición de venas extra, Figura R22. A, B) obtenemos alas que desarrollan multitud de venas (Figura R22. C).

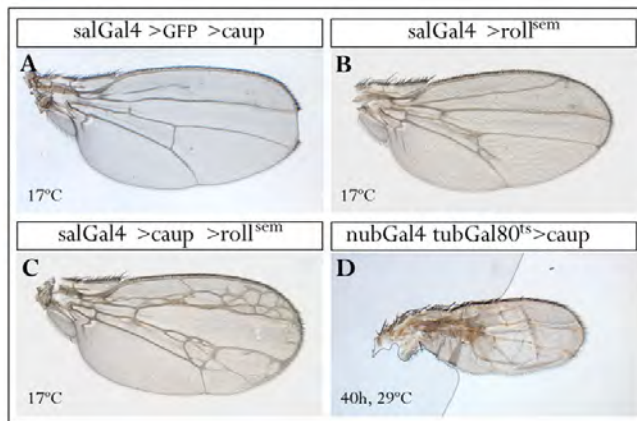


Figura R22. La sobre-expresión de *caup* junto con activación constitutiva de la vía de EGFR/MAPK (A-C) o la prolongación de la expresión de *caup* favorecen el desarrollo de venas ectópicas. Fenotipos representativos de alas obtenidas en las diferentes combinaciones genéticas que se indican.

El sinergismo entre *caup* y *roll^{sem}* a la hora de inducir el destino de vena podría deberse a un efecto de la vía del EGFR/MAPK sobre la transcripción de *caup*. Esta vía activa la expresión de *caup* en el notum presuntivo (Wang y cols., 2000) aunque en condiciones normales la expresión de *caup* en la provena L3 no depende de la vía del EGFR (Gómez-Skarmeta y Modolell, 1996). Sin embargo, la sobre-expresión de *roll^{sem}* no activa ectópicamente los niveles del *Caup* endógeno (Figura R24. A). Tampoco se puede atribuir el sinergismo a un efecto de la vía del EGFR sobre la transcripción del transgén *UAS-caup* ya que en éste la expresión de *caup* depende exclusivamente de la proteína Gal4.

La interacción podría deberse a que tanto *Caup* como *roll^{sem}* activan la vía del EGFR de modo que en condiciones de coexpresión el nivel de activación de la vía es suficientemente alto para especificar el destino de vena. Sin embargo, estos resultados también sugerían la posibilidad de una modificación postraducciona de *Caup* por la MAPK ERK. De hecho, el análisis de la secuencia aminoacídica de *Caup* nos reveló al menos 4 posibles sitios de fosforilación por MAPK además de los dos ya predichos por Gómez-Skarmeta y cols. (1996) (Anexo, Figura A1).

La fosforilación de un factor de transcripción como es *Caup* puede modificar su actividad haciéndolo por ejemplo más eficiente a la hora de activar la transcripción de alguno de sus genes diana. Por ello, examinamos la expresión de *rho* en condiciones de sobre-expresión de *caup* y *roll^{sem}*. Como se observa en la Figura R23. C la sobre-expresión de *roll^{sem}* no activa la expresión de *rho*, y la expresión conjunta de *roll^{sem}* y *caup* (Figura R23. D) no modifica apreciablemente la activación de *rho* asociado a la sobre-expresión únicamente de *caup* (Figura R23. B). Estos datos por tanto, no indican una modificación de la actividad de *Caup* sobre la expresión de *rho* por *roll^{sem}*.

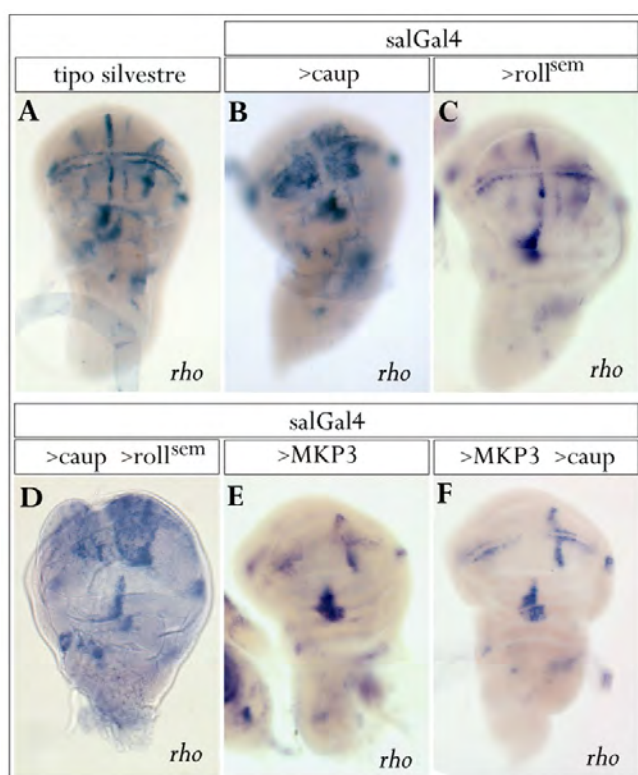


Figura R23. Efecto de la modificación en la actividad de la vía de Erk MAPK sobre *rho*. Expresión de *rho*, detectada con sonda de ARN, en discos imaginales de ala de tipo silvestre (A) y que expresan los transgenes indicados dirigidos por *salGal4* (B-F).

Otro efecto posible de la fosforilación de una proteína es un cambio en su estabilidad. Para determinar si el efecto de ERK MAPK sobre *Caup* consistía en la alteración de su estabilidad, sobre-expresamos *caup*·HA conjuntamente con la fosfatasa de Erk, MPK3 (Ruiz-Gómez y cols., 2005) y analizamos la acumulación de *Caup* endógeno y exógeno por tinción con anti-*Caup* y anti-HA, respectivamente. Observamos la desaparición tanto del *Caup* endógeno (Figura R24. B-B') como del *Caup* sobre-expresado (Figura R24 C-C" y F).

A pesar de que tanto la sobre-expresión de MPK3 (no mostrado) como la de *caup* inducen muerte celular en el disco imaginal de ala (Figuras R4. B, R24. D), la inhibición de la apoptosis mediante expresión conjunta de p35 (Hay y cols. , 1994) no impide que *Caup* se degrade en ausencia de la señalización por ERK (Figura R24. E). Nótese además que *Caup* no se detecta en células que se mantienen intactas marcadas por anti-lamina (Figura R24. F).

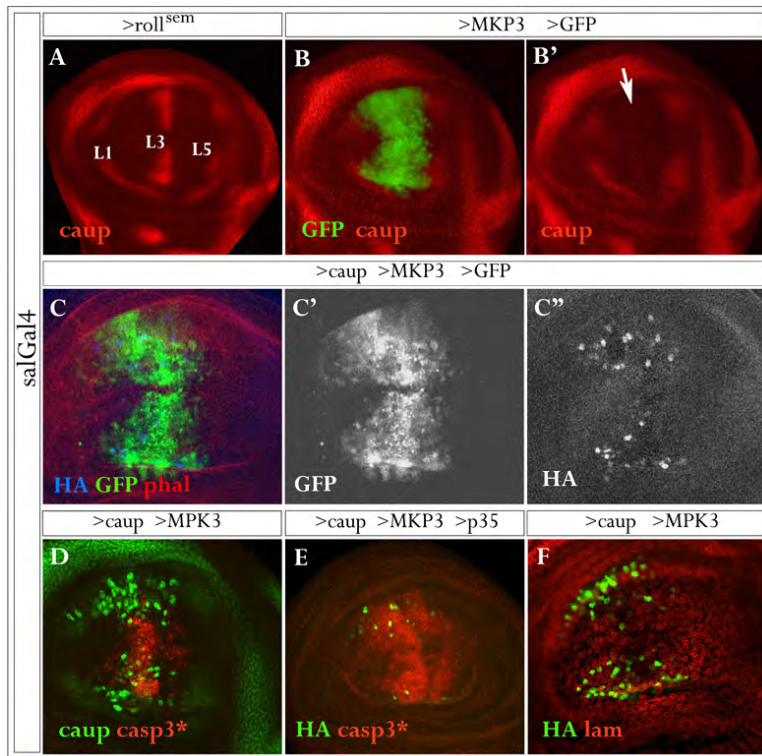


Figura 24. Inestabilidad de *Caup* cuando se inactiva la vía de Erk MAPK. Acumulación de *Caup* endógeno en discos imaginales de ala que sobre-expresan *roll*^{sem} (A) o MKP3 (B-B'). L1, L3 y L5 (en A) indican las provenas 1, 3 y 5 respectivamente. La flecha en B' señala la falta de *Caup* en L3 al expresar ectópicamente MKP3. (C-C'', F) La sobre-expresión de MKP3 elimina *Caup* ectópico (blanco en C''; verde en F). La sobre-expresión de MKP3 y *caup* (D) induce apoptosis. (E) La expresión conjunta con p35 no impide la pérdida de la proteína *Caup*. (F) La tinción con anti-laminina (lam) revela células del dominio *sal* que no presentan *Caup*.

Consistente con los resultados de que en condiciones de falta de actividad de Erk *Caup* se degrada, en discos que sobre-expresan MKP3 y *caup* bajo el control de *sal*/Gal4 no se detecta expresión de *rho* en el dominio *sal* (Figuras R23. F).

La determinación del territorio de vena/intervena se mantiene plástica hasta muy tarde en el desarrollo. De hecho, la señalización por EGFR es necesaria y suficiente para el desarrollo de las venas hasta al menos las primeras 24 h de desarrollo pupal (Díaz-Benjumea y García-Bellido, 1990; Sturtevant y Bier, 1995). La expresión de *ara/caup* en las venas L1, L3 y L5 se mantiene en el tipo silvestre hasta, al menos, 40 h DFP (después de la formación del pupario) (Figura I10). Sin embargo, en la combinación *sal*/Gal4 UAS-*caup*, la proteína *Caup* ectópica se detecta únicamente hasta aproximadamente 4 h APF (Anexo, Figura A2). Ante estos datos, nos preguntamos si el efecto sinérgico en la especificación de vena de la sobre-expresión conjunta de *roll*^{sem} y *caup* (Figura R22. C) se podía deber a la presencia de la proteína *Caup* durante más tiempo en el disco de ala por una mayor estabilidad de *Caup* fosforilado por MAPK. Para investigar este punto, decidimos prolongar el tiempo de expresión de *caup*. Expresamos transitoriamente *caup* con la línea *nub*Gal4; *tub*Gal80^{ts} a 29°C durante 40h a partir de la segunda mitad del estadio de LIII. En estas condiciones,

parte del territorio de ala se especifica como vena (Figura R22. D). Estos resultados apuntan a que *caup* se requiere de forma continua en el disco de ala desde LIII hasta bien entrada la pupación para determinar el destino de vena y que la fosforilación por la vía de ERK MAPK afecta a la estabilidad de la proteína Caup en las células del disco de ala.

2.2. Interacción de Caup con la vía de Dpp.

Como hemos visto, Caup activa la expresión de *rho* en el territorio presuntivo de ala (Gómez-Skarmeta y Modolell, 1996). Sin embargo, aunque se induzca la expresión de *caup* de forma generalizada en todo el disco imaginal (con la línea C765) *rho* sólo se activa en la región central del ala (Figuras I13 G, H y R20. B-C). Puesto que este territorio se asemeja al dominio de activación de la vía Dpp, quisimos conocer si Caup y la vía de Dpp interaccionaban genéticamente para activar la expresión de *rho*.

Para ello, sobre-expresamos *caup* en todo el disco en condiciones de activación de la vía de Dpp mediante expresión conjunta de *Tkv^{QD}* que codifica un receptor Tkv constitutivamente activo (Nellen y cols., 1996). Este experimento no fue concluyente ya que, como se había demostrado previamente en alas pupales (de Celis, 1997), la sobre-expresión de *Tkv^{QD}* por sí sola activa la expresión de *rho* de forma generalizada. De una forma similar ocurre cuando sobre-expresamos *Tkv^{QD}* conjuntamente con *caup* (Figura R25. A, B). Cabe anotar que la sobre-expresión de *Tkv^{QD}* no activa la expresión de *caup* (Figura R25. C).

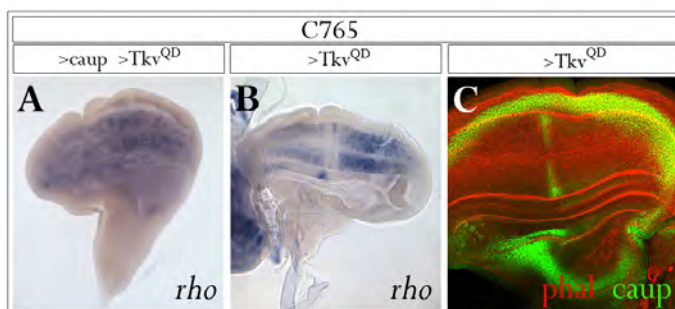


Figura R25. La sobre-expresión de *Tkv^{QD}* en el disco de ala activa la expresión de *rho* (B) sin activar la expresión de *caup* (C).

Caup interacciona genéticamente con p38b MAPK.

La proteína p38b MAPK está implicada en la señalización de la vía Dpp en el territorio de ala (Adachi-Yamada y cols., 1999b). Nos preguntamos si, por analogía con el caso de la vía del EGFR/MAPK, podría existir una modificación postraduccional de Caup por la MAPK p38b.

Llevamos a cabo un análisis de interacciones genéticas entre *caup* y p38b MAPK mediante la sobre-expresión de *caup* en fondos mutantes para p38b y para su activador la MAPKK *licorne* (*lic*, Suzanne y cols., 1999). En la Figura R26 se muestran los fenotipos obtenidos clasificados del I al III, siendo el I el fenotipo el más acusado y el III el más leve. De los resultados obtenidos podemos destacar que la expresión de *caup* sobre un fondo mutante

heterocigótico para *p38b* provoca un rescate del fenotipo en ala. Obtenemos un 83% de alas de tipo II y un 17% de tipo III frente a un 100% de tipo I cuando sobre-expresamos *caup* sobre fondo silvestre. De igual forma, observamos un rescate fenotípico al sobre-expresar *caup* sobre fondo mutante heterocigótico para *lic* o sobre el doble mutante heterocigótico para *p38b* y *lic* (Figura R26). Sin embargo, cuando sobre-expresamos *caup* conjuntamente con dos copias de UAS-*p38* o UAS-*p38^{DN}* el fenotipo obtenido es muy similar al de la sobre-expresión conjunta de *caup* y dos copias de UAS-GFP (Figura R26).

Estos datos sugieren que Caup interacciona genéticamente con la MAPK p38b, pero sólo con el análisis de los fenotipos adultos no podemos saber si p38b modifica la estabilidad de Caup, su función como activador de la expresión de *rho* o en ciclo celular.

Fenotipo Genotipo		I	II	III	n
salGal4	>caup	100%			26
	>caup, <i>p38⁻</i> / +		83%	17%	52
	>caup, <i>lic⁻</i> / +		75%	25%	28
	>caup, <i>p38⁻</i> / +, <i>lic⁻</i> / +		81%	19%	53
	>caup >GFP(x2)		87%	13%	24
	>caup > <i>p38</i> (x2)		72%	28%	46
	>caup > <i>p38^{DN}</i> (x2)		92%	8%	24

Figura R26. Caup interacciona genéticamente con p38 MAPK. Las sobre-expresiones se realizaron a 25 °C. (x2 indica la presencia de dos copias del transgén correspondiente).

2.3. Las MAPKs Erk y p38 fosforilan a Caup en células S2.

A continuación analizamos una posible fosforilación de Caup dependiente de MAPKs en cultivos celulares. Para ello, transfectamos células de *Drosophila* S2 con *caup*·HA. Tras inmunoprecipitar los lisados celulares con anti-HA, separamos las proteínas del inmunoprecipitado en geles de poliacrilamida en presencia de *Phos-tag*, un compuesto que une los grupos fosfato y favorece la separación de las proteínas en el gel según su grado de fosforilación. Como se observa en la Figura R27. A, el tratamiento de las células con el inhibidor de Tyr fosfatasas NaVO_4 durante 2 horas antes de lisarlas hace que aparezca una banda de menor movilidad electroforética, que no se detecta en la muestra no tratada con inhibidor, y por tanto correspondiente a Caup fosforilado. Prácticamente toda la proteína Caup se detecta fosforilada (es decir con movilidad reducida) cuando se tratan las células con Calyculin A (inhibidor de Ser/Thr fosfatasas) durante 2 horas antes de lisarlas.

Estos resultados indican la fosforilación Caup en células S2. Para determinar si la fosforilación ocurría efectivamente en Ser/Thr seguido de Prolina (Pro), secuencia diana de las MAPKs (Barsyte-Lovejoy y cols., 2002), analizamos la fosforilación de Caup mediante tinción con anticuerpos específicos contra fosfo-Ser/Thr-Pro. En este caso, utilizamos células S2 Tor^D EGFR (Vinos and Freeman, 2000) que expresan, por inducción con Cu₄SO, un receptor EGFR constitutivamente activo de modo que aumenta el nivel de activación de la vía de Erk MAPK. Transfectamos *caup*·HA en esta células e inmunoprecipitamos los lisados celulares con anti-HA. Determinamos la presencia en los inmunoprecipitados del epítipo fosfo Thr/Ser-Pro (mediante tinción con un anticuerpo específico). Utilizamos el sistema de imagen *Odyssey* que permite la visualización simultánea de las señales de dos anticuerpos diferentes (Figura R27. B). De esta forma en rojo se detecta la proteína Caup y simultáneamente en verde se detecta la proteína fosforilada en Ser/Thr-Pro. Como se observa en la Figura R27. B, en estas células Caup se encuentra fosforilado en la secuencia Ser/Thr-Pro.

Dado que nuestros datos en ala sugerían una posible interacción de Caup con Erk y p38 MAPK, inhibimos la actividad de estas quinasas en los cultivos celulares mediante tratamiento con PD98058 y SB203580, inhibidores específicos de Erk y p38 respectivamente. Como se observa en la Figura R27. B-C, el nivel de fosforilación de Caup disminuye con ambos tratamientos. Por el contrario, el tratamiento con el inhibido de la JNK, SP600125, no alteró el nivel de fosforilación de Caup (no mostrado).

Estos datos indican que Erk y p38 MAPK fosforilan a Caup en células S2 en cultivo y sugieren que en las células del disco imaginal de ala también podría actuar de forma similar.

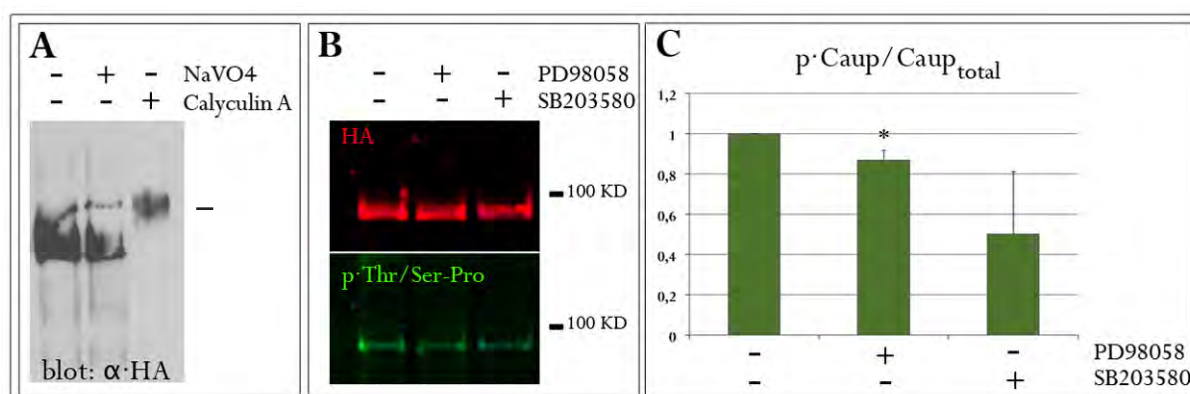


Figura R27. Fosforilación de Caup dependiente de Erk y p38 MAPK en células S2. (A) Western-blot de lisados de células S2 transfectadas con *caup*·HA, tratadas los inhibidores de fosfatasa NaVO₄ o Calyculin A, inmunoprecipitados con anti-HA y separados en geles con *Phos-tag*. El Western blot se incubó con anti-HA. La línea marca la posición de fosfo·Caup (B) Western blot revelado con el sistema Odyssey. Se inmunoprecipitaron con anti-HA lisados de células S2 Tor^D-EGFR transfectadas con *caup*·HA y tratadas o no con inhibidores específicos de Erk y p38 (PD98058 y SB203580 respectivamente). El Western-blot se incubó simultáneamente con anti-Caup (detectado en rojo) y anti fosfo-Thr/Ser-Pro (verde). (C) Nivel de fosforilación de Caup en Ser/Thr-Pro en células sin tratar y tratadas con los inhibidores de Erk o p38 MAPK (n=2).

2.4. Actividad de proteínas Caup mutantes puntuales de fosforilación.

Existen varios posibles sitios putativos de fosforilación por Erk o p38 MAPK en la secuencia aminoacídica de Caup (Gómez-Skarmeta y cols., 1996 y Anexo, Figura A1). Para intentar determinar cuáles de estos posibles sitios de fosforilación son funcionales *in vivo* realizamos mutagénesis dirigida de Caup cambiando las Ser o Thr a Alanina (Ala) y obtuvimos las siguientes construcciones: UAS-*caup*^{1A}, UAS-*caup*^{60A597A}, UAS-*caup*^{60A601A}, UAS-*caup*^{TT/AA}, UAS-*caup*^{3A}, UAS-*caup*^{4A}, UAS-*caup*^{5A} (ver Materiales y Métodos, Tabla M1). Además mutagenizamos dos de los sitios predichos a Aspártico (D) (UAS-*caup*^{DD}) con el fin de mimetizar una proteína Caup fosforilada constitutivamente. Todas estas construcciones se clonaron en fase con la secuencia de HA en 3' y se obtuvieron líneas de moscas transgénicas mediante el sistema de la integrasa ΦC31 (Bischof y cols., 2007). Este sistema nos permitió insertar todos los transgenes en el mismo punto del genoma de la mosca (en el mismo sitio de inserción de UAS-*caup* utilizado anteriormente) a fin de poder comparar la actividad de las diferentes proteínas Caup mutantes y de tipo silvestre.

A continuación se describen los datos preliminares de los ensayos funcionales de las proteínas Caup mutantes que estamos realizando.

Las proteínas mutantes puntuales de Caup detienen el ciclo celular.

En primer lugar analizamos los fenotipos en el ala causados por la sobre-expresión de los diferentes mutantes puntuales de Caup observando en todos los casos un fenotipo similar al causado por la sobre-expresión de *caup* de tipo silvestre: falta de vena L2, acercamiento entre las venas L4 y L5 y falta de tejido (Figura R28). Cabe resaltar que la sobre-expresión de las proteínas mutantes puntuales *caup*^{TT/AA}, *caup*^{60A597A}, *caup*^{60A601A}, *caup*^{3A}, *caup*^{4A}, *caup*^{5A} (Figura R28. C-F, H-I) y el mutante provocan un fenotipo notablemente más acusado mientras que *caup*^{1A} y *caup*^{DD} (Figura R28. B-C) causan un fenotipo más suave similar al de sobre-expresión de *caup* de tipo silvestre (Figura R26 fenotipo I y Figura R28. G).

Como hemos descrito en el capítulo anterior, este fenotipo parece deberse a parada del ciclo celular posiblemente por secuestro de CycE. Comprobamos que la sobre-expresión de *caup*^{5A} bajo el control de *salGal4* también provoca la parada del ciclo celular ya que hay una notable disminución de células en Mitosis en el territorio *sal* (Figura R29. A-A'). Expresamos *CycE* conjuntamente con *caup*^{5A} y observamos que se recupera la proliferación (Figura R29. B, B') y hay un rescate parcial del fenotipo adulto (Figura R29. C, compárese con Figura R28. C).

Estos datos sugieren que los mutantes puntuales de Caup analizados son capaces de detener el ciclo celular y apuntan a que las mutaciones introducidas no modifican la capacidad de Caup de unirse a CycE.

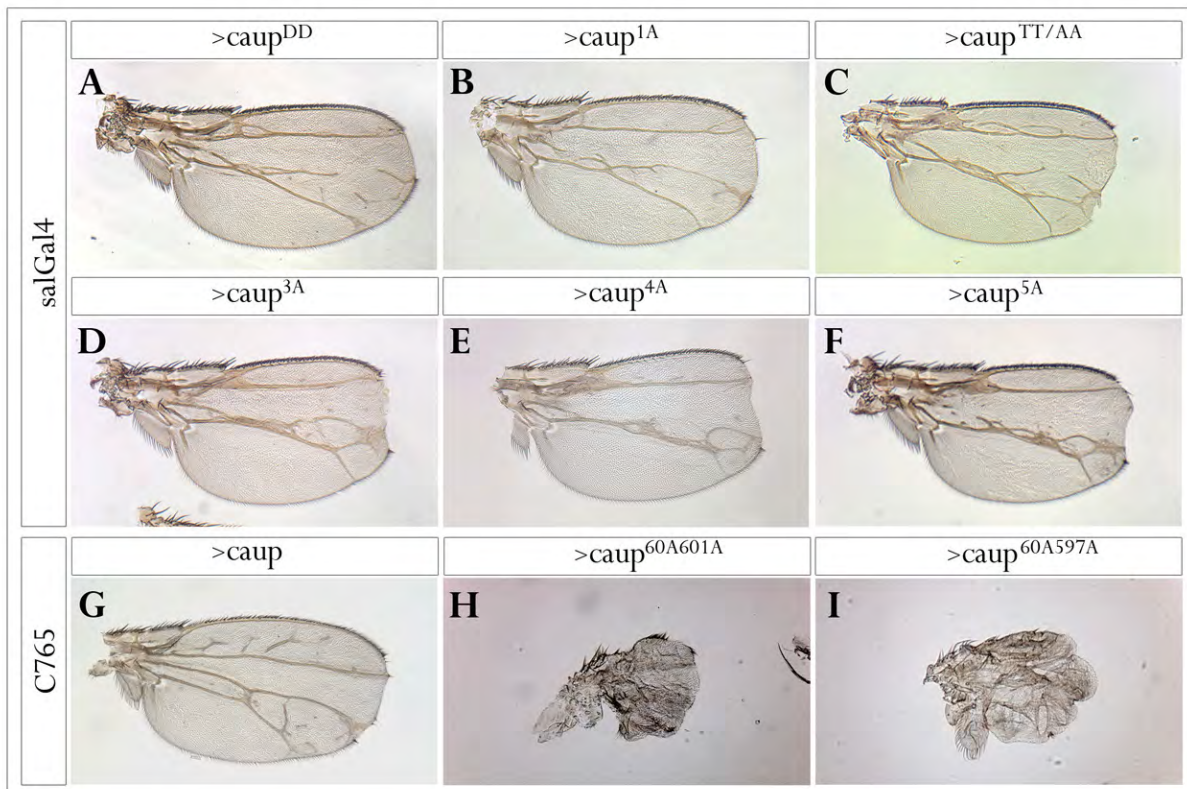


Figura R28. Fenotipos adultos representativos causados por la sobre-expresión de Caup y de los mutantes puntuales de Caup. Las sobre-expresiones se realizaron a 25 °C.

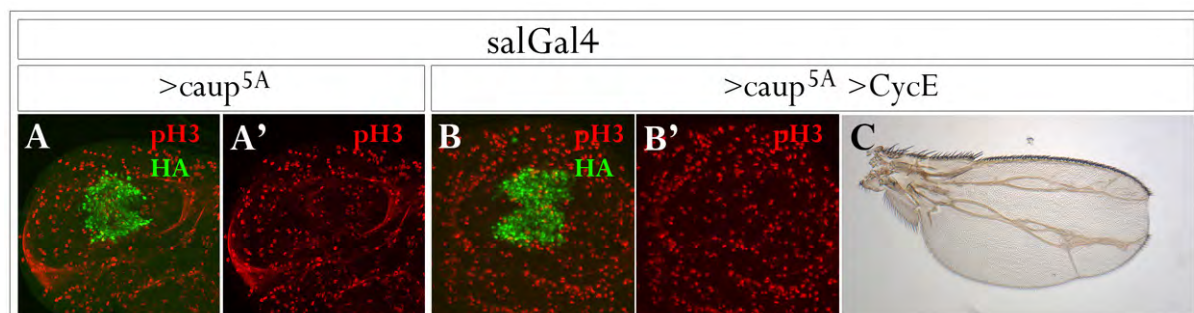


Figura R29. La sobre-expresión del mutante $Caup^{5A}$ interfiere con el ciclo celular. (A-A') Disminución del número de células en mitosis (tinción con pH3) en el dominio en el que se expresa $Caup^{5A}$. (B-B') Este fenotipo se rescata cuando expresamos conjuntamente $Caup^{5A}$ con $CycE$ (B-B'). El fenotipo adulto provocado por la expresión de $Caup^{5A}$ (Figura R28. F) se recupera en parte por co-expresión con $CycE$ (C).

Las proteínas mutantes puntuales de Caup activan la expresión de *rho*.

En segundo lugar hemos estudiado la capacidad de las proteínas Caup mutantes de activar la expresión de *rho*. Como se muestra en la Figura R30, la sobre-expresión de Caup^{1A} y Caup^{5A} activa la expresión de *rho*. Dado que las hibridaciones *in situ* no se han realizado en paralelo no podemos analizar un posible cambio en el nivel de activación de *rho* por sobre-expresión de estos dos mutantes puntuales de Caup. Sin embargo, podemos concluir que las mutaciones generadas en las proteínas Caup analizadas no suponen una modificación en la función de Caup como activador de la expresión de *rho*.

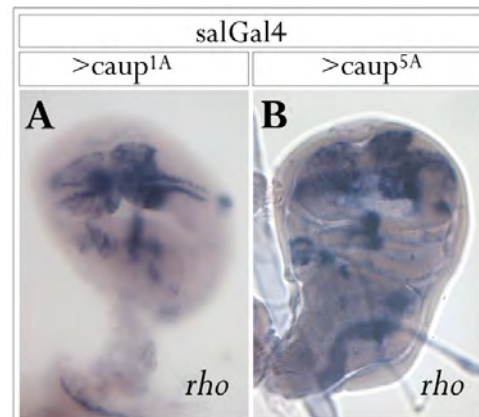


Figura R30. Los mutantes puntuales Caup^{1A} (A) y Caup^{5A} (B) son capaces de activar la expresión de *rho* en el territorio presuntivo de ala. Las sobre-expresiones se realizaron a 25°C.

La proteína mutante Caup^{TT/AA} es más estable que la proteína silvestre.

Dado que la actividad de las vías de EGFR y Dpp, mediados posiblemente por las MAPKs Erk y p38 respectivamente, es necesaria para la estabilidad de Caup en las células de territorio presuntivo de ala, analizamos la estabilidad de una de las proteínas mutantes puntuales de Caup. Sobre-expresamos transitoriamente *caup* y *caup*^{AA/TT} bajo el control de *nubGal4*; *tubGal80^{ts}*. Permitimos la expresión de los transgenes durante 12 h a 29 °C en tercer estadio larvario tras lo cual incubamos las larvas a 17 °C durante 3 h, 5h 30 min u 8 h antes de fijar los discos. Como se muestra en la Figura R31. A-C, la proteína Caup desaparece de las células a partir de las 5 h y 30 min, no siendo casi detectable a las 8 horas. Sin embargo la proteína mutante Caup^{TT/AA} se detecta a niveles casi constantes durante, al menos, 8 h (Figura R31. D-F).

Estos resultados nos permiten concluir que la proteína mutante puntual Caup^{TT/AA} es más estable que la proteína Caup silvestre, lo que podría explicar que el fenotipo de sobre-expresión causado por Caup^{AA/TT} en el ala adulta sea más acusado que el provocado por la sobre-expresión de *caup* de tipo silvestre.

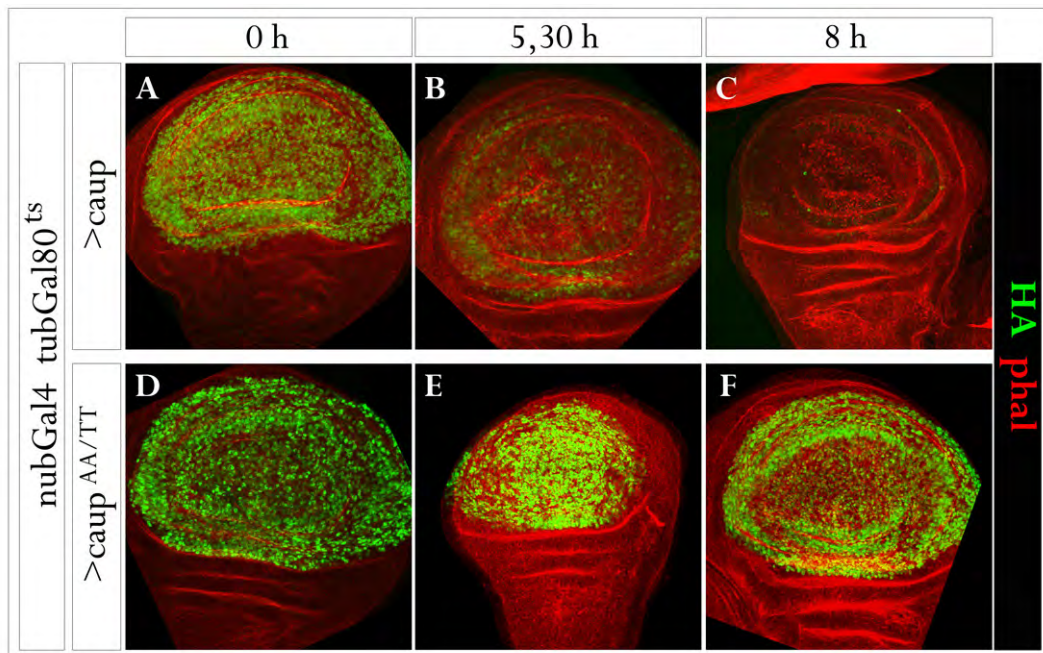


Figura R31. La proteína mutante Caup^{TT/AA} es más estable que Caup de tipo silvestre en las células del territorio presuntivo de ala. Se expresaron UAS-caup y UAS-caup^{AA/TT} durante 12 horas a 29 °C en discos de ala. Se analizó el nivel de Caup y Caup^{TT/AA} por tinción con anti-HA tras 0 h (A, D), 5,30 h (B, E) y 8 h (C, F) de impedir su transcripción.

DISCUSIÓN

Los factores de transcripción Iro/Irx desempeñan numerosas funciones durante el desarrollo de *Drosophila* y vertebrados, tales como la definición de territorios y formación de patrón, e indirectamente participan, en el control del crecimiento del tejido al generar bordes organizadores (revisado en Cavodeassi y cols., 2001). Para profundizar en el estudio de la función y regulación de Caup hemos generado una serie de herramientas que nos permiten sobre-expresar *caup* y varios mutantes *caup in vivo* y en cultivos celulares. Experimentos de sobre-expresión, apoyados por otros en condiciones de falta de función de los genes del C-Iro, nos han permitido proponer un mecanismo de actuación de Caup como regulador negativo del ciclo celular, demostrar que la vía de señalización de EGFR/MAPK se requiere a nivel postraducciona para la estabilidad de Caup en las células del disco de ala, que Caup se fosforila en Ser/Thr-Pro en células S2 y profundizar en los mecanismos moleculares que controlan la actividad de Caup en la formación del patrón de venas.

1. CAUP COMO REGULADOR NEGATIVO DEL CICLO CELULAR.

1.1. Efecto de la falta de función de los genes Iro sobre el ciclo celular.

Ya se había descrito previamente una función indirecta los genes *Iro/Irx* en el crecimiento de un tejido, a través de la formación de bordes organizadores (Cavodeassi y cols., 1999; Cavodeassi y cols., 2000; Diez del Corral y cols., 1999; Rodriguez-Seguel y cols., 2009; Villa-Cuesta y Modolell, 2005). En esta Tesis demostramos que los genes del C-Iro controlan de modo autónomo celular la proliferación.

En la primera parte de esta Tesis nos preguntamos por qué la sobre-expresión de *ara* en el disco imaginal de ala provocaba el desarrollo de un ala un 30% más pequeña que la de tipo silvestre (Gomez-Skarmeta y cols., 1996). Estos resultados sugerían que *ara* controlaba el tamaño de este apéndice en dichas condiciones experimentales por lo que nos planteamos estudiar si esta función también la ejercería a niveles endógenos.

Estudios previos basados en condiciones de falta de función de los genes *Iro* (González-Pérez, 2009; Pichaud y Casares, 2000) habían sugerido un papel de los mismos como represores de la proliferación de las células del compartimento dorsal del ojo pero no se había analizado en detalle el efecto de la insuficiencia de *Iro* en proliferación celular ni se había estudiado la implicación de las proteínas Iro en el progreso del ciclo celular.

Hemos determinado los perfiles de ciclo celular mediante FACS en células disgregadas de discos imaginales de ala para dos condiciones mutantes de falta de función de los genes *Iro*: heterocigosis para un mutante insercional en el segundo intrón de *ara* (*IroGal4*) y el mutante *iroGal4* sobre la deficiencia *iro*^{DFM3} (Figura I9. A). En la población de células mutantes *iro*⁻ observamos un porcentaje de células en fase G1 significativamente menor que en la población de células de tipo silvestre, mientras que el porcentaje de células en fase S

o G2 aparece aumentado en las células mutantes con respecto a las de tipo silvestre (Figura R10). Estas diferencias sugieren que las células mutantes *Iro* atraviesan la fase G1 en menor tiempo que las células de tipo silvestre y que compensan este acortamiento de la fase G1 mediante un alargamiento de las fases S y G2. Como demostraron Neufeld y cols. (1998) las células del disco imaginal de ala que tienen acelerada una de las fases del ciclo celular lo compensan alargando las otras fases del mismo.

Llama la atención que los perfiles de ciclo celular obtenidos para las dos condiciones mutantes *iro*⁻ (*iroGal4/+* e *iroGal4/iro*^{DFM3}) son prácticamente iguales a pesar de que la dosis de genes *Iro* es muy diferente. Una posible explicación a este hecho podría ser el mecanismo de autorregulación que estos genes presentan entre sí (ver Apéndice, N. Barrios, DEA, 2009). Así, los clones de sobre-expresión de *ara* o *caup* en la región del notum inhiben la expresión de *LacZ* presente en la inserción *ara*^{rF209} o mediada por el elemento regulador *IroRE*² (Letizia y cols., 2007). De manera recíproca, los mutantes *iro* hipomorfos podrían incrementar la expresión de los genes *Iro* no alterados consiguiendo elevar la dosis final de proteína *Iro*.

En consonancia con los datos de FACS, también observamos un mayor número de células en fase M en los territorios presuntivos de notum y ojo dorsal anterior de discos imaginales mutantes *iro*^{DFM3/iro}^{EGP1} (Figura R9), que son los dominios mayoritarios de expresión de los genes del C-*Iro* en estos discos.

Una mayor proliferación de las células de un tejido pueden causar sobre-crecimientos del órgano adulto. Sin embargo los tejidos cuentan con diferentes mecanismos, como son la inducción de la apoptosis o la disminución del tamaño celular, mediante los que se mantiene la homeostasis del tamaño final del órgano (Hipfner y Cohen, 2004). En las células mutantes *iro*⁻ se induce una mayor tasa de muerte celular (Figura R11. C-D), sobre todo en la región presuntiva de notum donde también se detecta un mayor aumento de proliferación en condiciones mutantes *iro* (Figura R9). De esta manera, en los mutantes *iro* el tamaño del notum adulto no parece verse afectado. Sin embargo, este mecanismo parece no ser suficiente para evitar totalmente los sobre-crecimientos en el disco de ojo y sus derivados. Así, en los mutantes *iro*^{DFM3/iro}^{EGP1} se observan sobre-crecimientos de la parte dorsal del ojo adulto en un 18% de los adultos y un 40% de los faratos (E. González-Pérez, 2009). Por otra parte, los mutantes *iro*⁻ podrían compensar el exceso de proliferación con una disminución del tamaño celular. Aunque no hemos analizado en detalle el tamaño de las células *iro*⁻, si hemos calculado la densidad celular en la vena L3 de adultos *iroGal4/iro*^{EGP7} observando que presentan una media de un 15% más células que los adultos de tipo silvestre (Anexo, Figura A3) lo que sugiere un menor tamaño celular.

Como ya hemos mencionado, los límites de expresión de los genes del C-*Iro* son bordes organizadores con capacidad de dirigir el crecimiento de territorios adyacentes de axila o de ojo ventral (Cavodeassi y cols., 1999; Diez del Corral y cols., 1999; Villa-Cuesta y

Modolell, 2005). En esta Tesis, no se ha analizado un posible cambio en la proliferación en los territorios adyacentes que podrían verse afectados en los mutantes *iro*⁻ analizados.

1.2. Efecto de la ganancia de función de los genes *Iro* sobre el ciclo celular.

Por otra parte, hemos demostrado que la sobre-expresión de los genes *Iro* causa la parada de la proliferación, ya que estas células no muestran tinción con anti-pH3 (Figura R5. C-D”) ni incorporan el análogo de timidina EdU (Figura R6.). De acuerdo con los resultados de las interacciones genéticas con diferentes componentes del ciclo celular, la sobre-expresión de *caup* inhibe el avance del ciclo de fase G1 a S. Cuando inducimos la expresión conjunta de *caup* y *CycE* se recupera la división de celular (Figura R8. B-B’) y se desarrollan alas similares a las de tipo silvestre (Figura R7. B).

De igual forma, observamos cierto rescate cuando co-expresamos *caup* con *E2f/dDP* aunque en este caso no podemos descartar un efecto de titulación del Gal4 (Figura R7. C). En consonancia con estos resultados, la sobre-expresión de *caup* sobre fondos mutantes heterocigóticos para *CycE* o su quinasa efectora *cdc2c* agravan el fenotipo mutante observando (Figura R7. I-J).

Debido a que se han descrito mecanismos de regulación recíproca entre los complejos *CycE/Cdc2c* y *E2f/dDP*, los resultados anteriores no permitían determinar a qué nivel interfería la sobre-expresión de *caup* con el paso de G1 a S. Para investigarlo, realizamos tinciones de discos imaginales de ala que sobre-expresaban *caup* con anticuerpos específicos que reconocen dianas de estos complejos. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad de *CycE/Cdc2c* se encuentra inhibida mientras que el complejo *E2f/dDP* continúa activo. El hecho de que PCNA (diana de *E2f/dDP*) se exprese a niveles más altos que en las células de tipo silvestre podría deberse un aumento de la actividad de *E2f/dDP* o simplemente, a que su actividad permanece constante al no avanzar el ciclo a fase S. Por otra parte, se ha descrito que la sobre-expresión de *E2f/dDP* activa la expresión de *cycE* en el disco de ala (Duronio y cols. , 1996; Royzman y cols. , 1997). Como encontramos que en las células que sobre-expresan *caup* no aumenta la expresión de *cycE* (Figura R12. C), este dato no apoyaría un incremento de la actividad de *E2f/dDP*.

Las células que sobre-expresan *caup* no presentan alteración en el nivel de expresión de *cycE* pero acumulan una mayor cantidad de proteína *CycE* (Figura R14. C-C’). Un resultado similar se observa en condiciones de falta de función de *cdc2c* (Clurman y cols., 1996; Sukhanova y Du, 2008). Esta quinasa necesita a *CycE* para ser activa pero su unión conduce a la fosforilación de *CycE* que la envía a degradación (Clurman y cols. , 1996). Por lo tanto, altos niveles de *CycE* no son indicativos de una alta actividad *CycE/Cdc2c*, sino de una falta de actividad del complejo. En nuestro caso, el aumento de *CycE* no parece deberse a una insuficiencia de *Cdc2c* puesto que la sobre-expresión conjunta de *cdc2c* con *caup* no rescata el fenotipo mutante de ala adulta (Figura R7. D). Sin embargo, podría explicarse

por un secuestro de CycE por Caup que le impidiese unirse a Cdc2c y formar complejos activos ya que el fenotipo mutante se rescata al aumentar de modo exógeno los niveles de CycE (Figura R7. B).

Hemos demostrado que, al menos en células S2, Caup·HA y CycE endógena se unen formando un complejo (Figura R15). Aunque estos resultados deberían confirmarse en las células del disco imaginal de ala, refuerzan la hipótesis de que Caup se une a CycE impidiendo la formación de los complejos CycE/Cdc2c.

1.3. Modelo de regulación del ciclo celular por Caup.

El paso más crítico a regular durante el ciclo celular es la transición de fase G1 a S (Moroy y Geisen, 2004). Una vez que la célula entra en fase S la transcripción disminuye a favor de la replicación de DNA, y en la fase G2 la doble carga génica no es una condición beneficiosa para la célula. Por lo tanto, la célula debe tener mecanismos que aseguren que la transición de G1 a S sólo ocurra en el momento óptimo y que sea irreversible.

Según los datos obtenidos en esta Tesis, los genes del *C-Iro* codifican factores de transcripción con capacidad de regular el progreso del ciclo desde fase G1 a S por un mecanismo independiente de la regulación transcripcional. Proponemos un modelo en el que las proteínas Iro, mediante el secuestro de CycE, podrían inhibir la actividad del complejo CycE/Cdk2 hasta que se alcance un nivel óptimo de CycE que asegure el paso correcto a la fase S. De este modo la insuficiencia de proteínas Iro causaría una transición acelerada de fase G1 a S, mientras que la sobre-expresión de estos genes detendría el ciclo celular justo antes del final de la fase G1.

Otros factores de transcripción implicados inicialmente en la determinación de destinos celulares, como son las proteínas proneurales Atonal, Ac y Sc, también intervienen en el control de la proliferación celular (Bossuyt y cols., 2009; Chang y cols., 2008; Johnston y Edgar, 1998). Atonal y Ac/Sc regulan proliferación celular activando la transcripción de *dap* o reprimiendo la de *stg*, respectivamente (Bossuyt y cols., 2009; Chang y cols., 2008; Johnston y Edgar, 1998). Se ha descrito que proteínas Irx, directa o indirectamente, controlan la expresión de los reguladores de ciclo celular p21 y XGADD45 (de la Calle-Mustienes y cols., 2002; Myrthue y cols., 2008), controlando así el progreso el ciclo celular.

La capacidad de regular el ciclo celular y diferenciación se extiende también a las ciclinas. Así CycD interacciona con factores de transcripción modulando la expresión de genes del desarrollo (Bienvenu y cols., 2010). Con los resultados obtenidos hasta este momento no podemos descartar la posibilidad de que la unión entre Caup y CycE modifique la actividad transcripcional de Caup además de controlar el avance del ciclo celular.

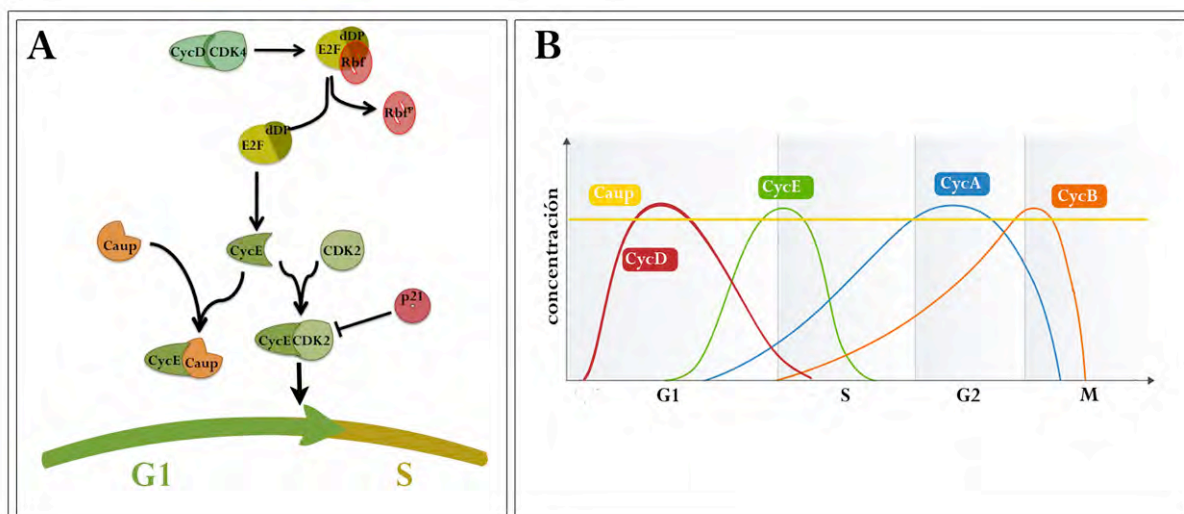


Figura D1. Modelo de regulación por Caup del paso G1/S. (A) Caup competiría con Cdk2 por la unión a CycE. (B) La concentración constante de Caup en la célula impediría la actividad de CycE/Cdk2 hasta que se alcanza un nivel de CycE lo suficientemente alto como para formar el complejo CycE/Cdk2 y asegurar el paso a la fase S.

1.4. Posibles papeles biológicos de la regulación del ciclo celular por los genes *Iro*.

Durante el desarrollo de un organismo la división celular debe estar estrictamente regulada simultáneamente con la especificación de los diferentes tipos celulares que constituirán el individuo adulto. Aunque aún no se conocen bien los mecanismos subyacentes, hay claras conexiones entre la proliferación y la diferenciación. La diferenciación tiene lugar en células quiescentes y en este sentido se han identificado numerosos factores de transcripción que dirigen la diferenciación a la vez que reprimen la proliferación (Bossuyt y cols., 2009; Calo y cols., 2010; Chang y cols., 2008; Johnston y Edgar, 1998). En particular, muchos factores de transcripción con homodominio actúan sobre el ciclo celular de forma directa o indirecta (revisado en Del Bene y Wittbrodt, 2005).

La expresión del C-*Iro* es necesaria para el desarrollo de las venas L1, L3 y L5 durante el final de tercer estadio larvario y como sugerimos en esta Tesis durante la pupación. Los territorios de las provenas, además del borde D/V y los grupos proneurales, son zonas no proliferativas del disco de ala durante final del tercer estadio larvario (González-Gaitán y cols., 1994; Milán y cols., 1996b; O'Brochta y Bryant, 1985; Usui y Kimura, 1992). Dado que hemos demostrado que Caup controla negativamente la proliferación, es posible que su expresión en las venas se requiera para detener el ciclo celular además de para especificar el destino de vena.

Por otra parte, los genes *Iro* son componentes del prepatrón de OS en el tórax dorsal y su falta de función causa la ausencia de las quetas laterales (Leyns y cols., 1996). Sin embargo la sobre-expresión de estos genes en el territorio presuntivo de notum durante

estadios larvarios causa también la pérdida de quetas en el adulto (Ikmi y cols., 2008). E. González-Pérez (2009) demostró que en condiciones silvestres Ara/Caup desaparece de la CMOS. Quizás Ara/Caup se eliminan de forma activa en estas células para permitir que la CMOS divida para dar lugar a las cuatro células que constituyen el OS. Por tanto, Ara/Caup tendrían una función redundante a la de Ac/Sc (Chang y cols., 2008) en el control del ciclo celular en la CMOS aunque actuando en diferentes fases del ciclo.

En tercer lugar, cabe sugerir una posible función de los genes *Iro* como controladores del tamaño de regiones de los discos imaginales a través de los cuales difunden los morfógenos que especifican los diferentes territorios. Así, para que el disco de ojo alcance un tamaño adecuado, se requiere proliferación en el territorio anterior al SM para alejar la fuente de Wg (anterior), que de otro modo reprimiría a Dpp (en posterior), y permitir el avance del SM y la diferenciación de los omatidios (Kenyon y cols., 2003; revisado en Dekanty and Milan, 2011). La expresión de los genes *Iro* durante el desarrollo temprano en el territorio de ojo dorsal es necesaria para la formación del borde DV que dirige el crecimiento del ojo (Cavodeassi y cols., 1999). En los mutantes *iro*^{EGP1} habría suficiente proteína Iro para generar el borde D/V. Los sobre-crecimientos en la región dorsal del ojo observados en estos mutantes podrían explicarse porque la disminución en los niveles de proteínas Iro hace que las células proliferen más. De esta forma se alejarían las fuentes de Wg y Dpp favoreciendo el avance del SM, y se desarrollaría un ojo de mayor tamaño. Un papel similar se ha descrito para *osa*, cuya sobre-expresión en el territorio de ojo causa parada del ciclo celular y la detención del SM (Baig y cols., 2010).

1.5. Implicación en la formación de tumores.

El desarrollo del cáncer implica la adquisición por parte de las células de un conjunto de características tumorales que incluyen la inducción de proliferación, evasión de la actividad de los genes supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, capacidad invasora y metástasis entre otras (Hanahan y Weinberg, 2011). La bases genéticas y moleculares que llevan a la adquisición de tales características están conservadas a lo largo de la evolución. Por esta razón *Drosophila* se ha convertido en un excelente modelo para identificar y estudiar los genes y vías de señalización implicados en la carcinogénesis (revisado en Halder y Mills, 2011; Polesello y cols., 2011).

Los resultados obtenidos en esta Tesis indican que los genes del C-*Iro* controlan negativamente el ciclo celular. Como por otra parte, se conoce que los genes *Iro* están implicados en el desarrollo de diversos tipos de cáncer en humanos (Bennett y cols., 2008; Bennett y cols., 2009; Guo y cols., 2010; Lu y cols., 2005; Myrthue y cols., 2008), quisimos analizar el papel de estos genes en diferentes modelos de desarrollo tumoral en *Drosophila*.

Hemos utilizado tres modelos diferentes de formación de tumores en discos imaginales de ala o de ojo: modelo de inhibición de la vía de Hippo (Halder y Johnson, 2011), modelo

de alteración de la polaridad celular por sobre-expresión de una forma constitutivamente activa de DaPKC (Sotillos y cols., 2004) y modelo de activación de la vía de Notch y modificación epigenética (Ferrés-Marcó y cols., 2006). En los tres casos la sobre-expresión de *Caup* inhibe el sobre-crecimiento del tejido asociado a dichas alteraciones genéticas actuando como un gen supresor de tumores (Figuras R16-18). Aun más interesante es la observación de que una insuficiencia de *mirr* es capaz de inducir crecimiento tumoral en el ojo en un fondo genético sensibilizado (Figura R.19). Por lo tanto, en estos modelos tumorales *caup* actuaría como un gen supresor de tumores. La capacidad de *Caup* de secuestrar CycE e impedir por tanto la formación del complejo CycE/Cdk2 sugiere que, al menos en el caso del modelo Hippo, la titulación por *Caup* del exceso de CycE que se produce al inhibir la vía de Hippo, sería la causa de la limitación del crecimiento tumoral por sobreexpresión de *caup*.

Teniendo en cuenta que la desregulación de la proliferación están muy relacionada con la transformación tumoral, no sorprende la asociación encontrada entre mutaciones en genes *Irx* y diversos tipos de cáncer. En humanos los genes *Irx* parecen funcionar como genes supresores de tumores en cáncer gástrico o en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Bennett y cols., 2009; Guo y cols., 2010; Lu y cols., 2005) sin embargo también se ha descrito un papel como oncogenes en la inducción de la proliferación en cáncer de próstata (Myrthue y cols., 2008). En este último caso la disminución en la expresión de *Irx5* causa un aumento en el nivel del inhibidor de Cdk p21, mientras que la sobre-expresión la disminuye (Myrthue y cols., 2008). En el caso del disco imaginal de ala, la sobre-expresión de *Caup* no modifica ni la expresión de *dap/p21* (Figura R12. F) ni el nivel de su producto proteico (Anexo, Figura A4) sino el nivel de CycE. En el futuro sería interesante estudiar si los genes del C-*Iro* pueden modular el ciclo celular de diferente forma dependiendo del tipo celular y de las vías de señalización activas que puedan modificar la función de las proteínas *Iro*.

2. REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE CAUP.

La regulación a nivel transcripcional de los genes del C-*Iro* está controlada por diferentes vías de señalización dependiendo del tejido. Por ejemplo, en el territorio presuntivo de notum las vías del EGFR y Dpp tienen efectos opuestos sobre la expresión de los genes *Iro* (Cavodeassi y cols., 2002; Zecca y Struhl, 2002a). En esta Tesis, proponemos que la vía del EGFR controla la función de los genes *Iro* también a nivel postraducciona l en el disco de ala regulando su estabilidad. Los experimentos realizados en células S2 demuestran que *Caup* es una fosfo-proteína y que la fosforilación disminuye en presencia de inhibidores de las MAPKs Erk y p38 (Figura R27). Sugerimos que Erk interviene, al menos en la estabilidad de la proteína *Caup*, aunque no descartamos la posibilidad de que tanto Erk como p38b también regulen su actividad transcripcional como ha sido demostrado en otros modelos (Carrasco-Rando y cols., 2011; Matsumoto y cols., 2004). En concordancia con nuestros

datos, hay que destacar que en otro tipo celular también se ha detectado fosforilación de Caup en Ser (Bodenmiller y cols., 2007).

2.1. Control de la estabilidad de Caup.

En la segunda parte de esta Tesis nos preguntamos por qué la sobre-expresión de *caup* bajo el control de C765 o *salGal4* no causaba la especificación como vena del territorio presuntivo de ala a pesar de activar la expresión de *rho* (Figura R20. C). Como se observa en la Figura R21. B, la sobre-expresión de *caup* también conlleva la activación de DI en las células, pero no parece ser suficiente para activar la vía de EGFR a altos niveles (Figura R21. D). Dado que se requieren altos niveles de activación de esta vía para la especificación y mantenimiento del destino de vena (Diaz-Benjumea y Garcia-Bellido, 1990; Sturtevant y Bier, 1995) unos niveles insuficientes podrían ser la causa de que el territorio que sobre-expresa *caup* no se determine finalmente como vena. De hecho, cuando expresamos conjuntamente *caup* y *roll^{sem}*, se observa un fenotipo adulto con multitud de venas extra (Figura R22. C) que no aparecen en la sobre-expresión de los mismos transgenes por separado. Este resultado puede sugerir una cooperación entre *caup* y *roll^{sem}* en la activación de la vía de EGFR.

Otra posibilidad es que *roll^{sem}* afecte a la estabilidad de Caup, ayudando a prolongar el efecto de esta proteína sobre la diferenciación de las venas. De hecho, cuando prolongamos el periodo de sobre-expresión de *caup* hasta estadio de pupa (expresando *caup* bajo el control de *nubGal* durante 40h a 29°C desde el final del desarrollo larvario) encontramos que parte del ala se determina como vena ectópica (Figura R22. D). Este efecto no ocurre al expresar *caup* bajo el control de *salGal4* (Figura R22. A) cuya expresión se extiende sólo hasta las 4 primeras horas del desarrollo pupal (Anexo, Figura A2). De acuerdo con una estabilización de Caup dependiente de la actividad de Erk MAPK, la inhibición de la actividad de esta quinasas por sobre-expresión de MKP3 (Ruiz-Gómez y cols., 2005) hace disminuir notablemente el nivel de proteína Caup en el disco, afectando tanto a la proteína endógena como a la resultante de la sobre-expresión de *caup* (Figura R24. C, F).

En conjunto estos resultados apoyan un modelo (Figura D2) por el cual los genes *ara/caup* se requieren durante el desarrollo larvario y pupal para la especificación de venas. Estos genes son responsables de la expresión de *rho* en L3 que ayudaría a mantener la activación de la vía del EGFR a altos niveles. A su vez, la actividad de esta vía estaría implicada en la estabilización de las proteínas Ara/Caup en el territorio de vena.

2.2. Regulación de la actividad transcripcional de Caup.

La fosforilación de proteínas Iro/Irx dependiente de MAPKs afecta a su actividad como factores de transcripción. En el pollo *Irx2* se expresa en el cerebelo y media la respuesta

de esta región a la señalización por FGF8 (Matsumoto y cols., 2004). En presencia de la actividad de la vía FGF8/MAPK *Irx2* actúa como un activador transcripcional mientras que en condiciones de falta de función de FGF8/MAPK actúa como un represor. De forma similar, en *Drosophila* hemos demostrado que *Ara/Caup* se expresan en los precursores de los músculos latero-transversales del embrión donde la señalización por EGFR/MAPK es nula o muy baja y actúan como represores de transcripción. Sin embargo, si se activa la vía de EGFR/MAPK, *Ara/Caup* actúan como activadores transcripcionales (Carrasco-Rando y cols., 2011).

En esta Tesis, nos preguntamos si también la fosforilación de *Ara/Caup* dependiente de MAPK en las venas L1, L3 y L5 modificaría su actividad transcripcional convirtiéndolas en activadores de la expresión de *rho*. La activación de Erk (en condiciones de sobre-expresión de *roll^{sem}*) no parece afectar a la capacidad de *Caup* de activar a *rho* (Figura R 23. D). Por otro lado, la degradación de la proteína *Caup* al bloquear la actividad de Erk (Figura R24. C-C" y D) impide determinar si la fosforilación de *Caup* dependiente de ERK modifica su capacidad para activar la expresión de *rho*.

Por otro lado, dado que la sobre-expresión de *ara/caup* en el disco imaginal de ala activa *rho* sólo en el dominio de señalización de la vía de Dpp en el territorio presuntivo de ala, nos planteamos si esta vía podría modificar la actividad de las proteínas *Iro* en relación a la expresión de *rho*. Los experimentos realizados no nos informan sobre si la actividad transcripcional de *Caup* se modifica por alteraciones de la vía de DPP. La sobre-expresión de *caup* de forma conjunta con *tkv^{QD}* activa la expresión de *rho* de forma similar a lo que ocurre cuando se sobre-expresa únicamente *tkv^{QD}* (Figura R25. A-B).

Por último hemos analizado la posible interacción genética entre *caup* y p38 MAPK que en *Drosophila* interviene en la señalización por la vía de Dpp en el territorio presuntivo de ala (Adachi-Yamada y cols., 1999b). Hemos encontrando que los fenotipos de ala causados por la sobre-expresión de *caup* en fondos mutantes heterocigóticos para *p38b* y/o para la quinasa que la activa, *lic*, son más suaves que cuando sobre-expresamos *caup* sobre fondo silvestre (Figura R26). Este rescate del fenotipo adulto podría significar que *Caup*, una vez más, es inestable en condiciones mutantes de *p38b*. Sin embargo, no descartamos un cambio en la actividad transcripcional de *Caup* sobre *rho*, para lo que se requiere un análisis de la expresión de *rho* en estas condiciones mutantes.

2.3. Modelo de regulación postraducciona de *Caup* durante la especificación de vena L3.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, sugerimos un modelo de regulación postraducciona de *Caup* por la vía del EGFR mediado por la actividad de Erk MAPK. En este modelo la fosforilación por Erk estabilizaría a *Caup* en las células de las venas L1, L3 y L5 donde se mantiene durante la pupación en condiciones silvestres. Por otra

parte, sugerimos que la vía de Dpp, quizás a través de p38, podría regular la actividad transcripcional de Caup permitiendo la expresión de *rho*.

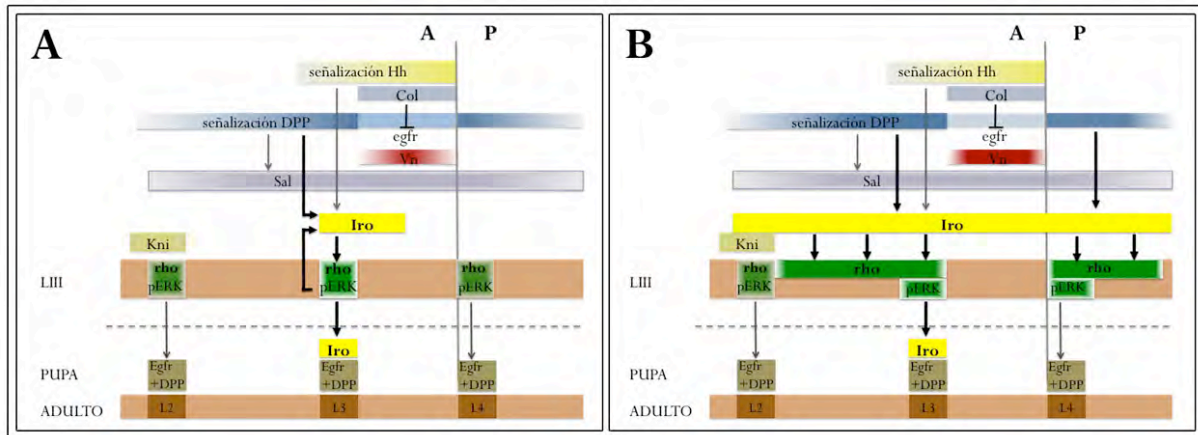


Figura D2. Modelo de regulación de la función de Caup durante la especificación de vena L3. (A) Esquema representativo de la regulación postraduccional de Iro por las vías de Dpp y EGFR. (B) Esquema representativo de la actividad de Iro en condiciones de sobre-expresión en el territorio de ala.

2.4. Búsqueda de las dianas de fosforilación por MAPK en la proteína Caup.

En esta Tesis hemos generado varios mutantes puntuales de Caup en los posibles sitios de fosforilación definidos por Gómez-Skarmeta (Gómez-Skarmeta y cols., 1996) y algunos de los predichos *in silico* con el fin de analizar las consecuencias de la fosforilación sobre la función de Caup. Lamentablemente, todos los mutantes puntuales de Caup obtenidos parecen no tener alteradas ninguna de las funciones analizadas (detención del ciclo celular y activación de *rho*) con respecto a la función de la proteína Caup de tipo silvestre (Figuras R29 y R30). La única modificación que parece causar la mutación TT/AA es un aumento en la estabilidad de la proteína en las células del territorio presuntivo de ala (Figura R31). Aunque no hemos realizado el ensayo de la estabilidad de todas las proteínas mutantes obtenidas, posiblemente los mutantes *caup*^{60A597A}, *caup*^{60A601A}, *caup*^{3A}, *caup*^{4A}, *caup*^{5A} codifiquen proteínas más estables que la de tipo silvestre y por ello su sobre-expresión en el disco de ala provoca un fenotipo más acusado (Figura R28).

En principio, una mayor estabilidad de las proteínas Caup en las que mutagenizamos algunos de los posibles sitios de fosforilación a Ala no apoyarían los datos anteriormente discutidos de que la fosforilación, al menos por Erk MAPK, estabilizaría la proteína Caup en la célula. Esta incongruencia podría deberse a cambios conformacionales de la proteína inducidos por las mutaciones que las hacen más estables independientemente de su grado de fosforilación o a que los sitios mutagenizados no son todos los sitios diana de la quinasa Erk, ya que hemos observado que incluso la proteína mutante *caup*^{5A} sigue degradándose cuando la sobre-expresamos conjuntamente con MKP3 (Anexo, Figura A5. B).

Astigarraga y cols. (2007) encontraron un motivo en la proteína Capicua, llamado dominio C (DC), que actúa como sitio de interacción con Rolled (Tanoue y Nishida, 2002). El DC se caracteriza por contener una serie de aminoácidos cargados positivamente rodeados por aminoácidos hidrofóbicos. Nosotros hemos analizado la secuencia aminoacídica de las proteínas Iro y encontramos que el dominio Iro-box conservado en todas las proteínas Iro/Irx tiene homología con los DC descritos en las dianas de MAPK (Tanoue y Nishida, 2002). Por esta razón, nos proponemos mutagenizar el dominio Iro-box de las proteínas Iro de *Drosophila* para intentar obtener una proteína Caup no fosforilable y estudiar su actividad.

Iro-Box de las proteínas Iro/Irx													
Ara	A _h	T	K ₊	P _h	K ₊	I _h	W _h	S	V _h	A _h	D ₊	T	V _h
Caup	A _h	S	K ₊	P _h	K ₊	I _h	Y _h	S	V _h	A _h	D ₊	T	A _h
Mirr	T	A _h	K ₊	P _h	R ₊	I _h	W _h	S	L _h	A _h	D ₊	M _h	A _h
Irx2	A _h	S	K ₊	P _h	K ₊	L _h	W _h	S	L _h	A _h	E ₊	I _h	A _h
Irx5	L _h	A _h	K ₊	P _h	K ₊	L _h	W _h	S	L _h	A _h	E ₊	I _h	A _h
Irx6	L _h	E ₊	K ₊	P _h	R ₊	I _h	W _h	S	L _h	A _h	H ₊	T	A _h

Figura D3. El dominio Iro-box de las proteínas Iro/Irx. Debajo de cada aminoácido aparece en rojo si es un aminoácido cargado positivamente (+) o un aminoácido hidrofóbico (h). La caja rosa delimita la Iro-box.

CONCLUSIONES

1. Los genes *Iroquois* controlan el ciclo celular de forma autónoma celular.
2. Las células de los discos imaginales mutantes *Iro* muestran la fase G1 más corta y las fases S y G2 prolongadas. Estas células muestran una tasa de proliferación mayor que las de tipo silvestre y una elevada muerte celular.
3. La sobre-expresión de los genes *Iro* interfiere con el progreso del ciclo celular, ralentizando el paso de G1 a S.
4. La parada del ciclo celular asociada a la sobre-expresión de *caup* se debe a la inhibición de la actividad del complejo CycE/Cdk2.
5. La sobre-expresión de *caup* no afecta a la transcripción de *CycE*.
6. *Caup* interacciona con CycE formando parte de un mismo complejo proteico en células S2 en cultivo. Por tanto, proponemos que podría inhibir la actividad del complejo CycE/Cdk2 compitiendo con Cdk2 por la CycE.
7. Los genes *Iro* actúan como supresores de tumores en los discos imaginales de ala y ojo.
8. *caup* se requiere de forma continua durante el tercer estadio larvario y la pupación para determinar el destino de vena en el ala.
9. La ruta del EGFR/ERK MAPK se requiere para estabilizar *Caup* en las células del disco imaginal de ala, lo que sugiere un papel de esta vía en el mantenimiento de *Ara/Caup* en las venas L1, L3 y L5 durante el desarrollo larvario y pupal.
10. Las MAPKs ERK y p38 fosforilan a *Caup* en células S2 en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. HERRAMIENTAS GENÉTICAS.

1.1. Cultivo de *Drosophila*.

Todas las estirpes y cruces de *D. melanogaster* crecieron en medio de cultivo estándar, y se mantuvieron en cámaras a 25 °C salvo en algunos casos en los que la temperatura de cultivo fue de 17 °C ó 29 °C.

1.2. Estirpes de *D. melanogaster*.

Como cepas de referencia se utilizaron *Oregon-R* o *y, w¹¹¹⁸*.

Los alelos mutantes utilizados han sido: *cdc2c²* (Lehner y cols., 1992); *cycE⁰⁵²⁰⁶* (Duronio y cols., 1996); *dap⁰⁴⁴⁵⁴* (de Nooij y cols., 1996); *lic^{G0252}* (Peter y cols., 2002), *iro^{DFM3}* (Gomez-Skarmeta y cols., 1996), *iro^{EGP1}* (González-Pérez, 2009); *iro^{EGP7}* (Andreu y cols., 2012), *p38^{d27}* (Cully y cols., 2010).

Las líneas Gal4 empleadas para dirigir la expresión génica fueron: *c765* (Gomez-Skarmeta y cols., 1996), *nubGal4*, (Calleja y cols., 1996); *ap^{MD544}* (Calleja y cols., 1996), *hhGal4* (Tanimoto y cols., 2000), *sal^{EPV}Gal4* (Cruz y cols., 2009) e *iroGal4* (Mazzoni y cols., 2008). En ocasiones se empleó la proteína *tubGal80^{ts}* (McGuire y cols., 2003) para el control temporal de la actividad de Gal4. Esta proteína bloquea la actividad de Gal4 y se inactiva a 29 °C, temperatura a la que Gal4 presenta su actividad máxima.

Las inserción marcadora de actividad transcripcional fue E(slp)mβ·CD2 (de Celis y cols., 1998).

Las líneas UAS utilizadas han sido: EP·MKP3 (Ruiz-Gomez y cols., 2005); UAS-*ara²⁹* (Gomez-Skarmeta y cols., 1996); UAS-*cdc2c* (Meyer y cols., 2000); UAS-*cycE* (Neufeld y cols., 1998); UAS-*dap* (Lane y cols., 1996); UAS-*dIAP1* (Peterson y cols., 2003); UAS-*e2f* UAS-*dDP* (Buttitta y cols., 2010); UAS-nls_eGFP, UAS-*mad* (Newfeld y cols., 1996); UAS-*DaPKC^{CAAX}* (Sotillos y cols., 2004); UAS-*p35* (Hay y cols., 1994); UAS-*p38* y UAS-*p38^{DN}* (Adachi-Yamada y cols., 1999b); UAS-*roll^{sem}* (Brunner y cols., 1994); UAS-*stg^{N14}* (Neufeld y cols., 1998); UAS-*tkv^{QD}* (Nellen y cols., 1996); UAS-*tkv⁺* (Nellen y cols., 1996), UAS-*yki* (Oh and Irvine, 2009), *eyGal4* UAS-*Dl* GS88A8 (UAS-*eyeful*, Ferres-Marco y cols., 2006) y UAS-RNAi·*mirr* (VDRC #50134 y VDRC #50133).

1.3. Análisis clonal.

Obtuvimos clones de células mutantes *iro* mediante la técnica FLP/FRT (Xu and Rubin, 1993) utilizando el cromosoma recombinante *iro^{EGP7} FRT2A*. Esta técnica se basa en la expresión, mediante un promotor inducible por choque térmico (promotor *hs*), de la enzima Flipasa (*Flp*) que actúa sobre las secuencias diana FRT provocando la recombinación

de las mismas. Para obtener los clones *iro*^{EGP7} indujimos la expresión del transgén *hs-flp* a 72-96 h AEL (*After Egg Laying*) por incubación de las larvas a 37 °C durante 60 min.

1.4. Obtención de moscas transgénicas.

La transformación de embriones se realizó por microinyección como se describe en (Karess and Rubin, 1984; Rubin and Spradling, 1982) utilizando el sistema de integración dirigida mediada por la integrasa ϕ C31 (Groth y cols., 2004). El vector de ADN empleado fue pUAS*attB* y la cepa huésped *y,w, M{eGFP, vas:int.Dm}ZH-2A; M{RFP, attP}ZH-51D* (Bischof y cols., 2007). Los transgenes se integraron en la posición 51D del cromosoma 2R.

La generación de transformantes fue realizada en la mayoría de los casos por Eva Caminero en la plataforma de transformación de *Drosophila* del proyecto Consolider-Ingenio-2007.

Transgén	Transformante
UAS-caup ^{WT} ·HA	UAS-caup
UAS-caup ^{T597/A} ·HA	UAS-caup ^{1A}
UAS-caup ^{S60/A·T597/A} ·HA	UAS-caup ^{60A597A}
UAS-caup ^{S60/A·T601/A} ·HA	UAS-caup ^{60A601A}
UAS-caup ^{T597/A·T601/A} ·HA	UAS-caup ^{TT/AA}
UAS-caup ^{S60/A·T597/A·T601/A} ·HA	UAS-caup ^{3A}
UAS-caup ^{S60/A3T473/A·T597/A·T601/A} ·HA	UAS-caup ^{4A}
UAS-caup ^{S60/A·T473/A·S534/A·T597/A·T601/A} ·HA	UAS-caup ^{5A}
UAS-caup ^{T597/D·T601/D} ·HA	UAS-caup ^{DD}

Tabla M1. Lista de transformantes generados.

1.5. Montaje de estructuras adultas.

Se utilizó el medio de montaje Ácido Láctico/Etanol (6:5) para las preparaciones de alas adultas (realizadas por Rosario Hernández).

2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Los experimentos generales de Biología Molecular que no se detallan se realizaron según los protocolos habituales descritos en Sambrook y cols., 1989.

2.1. Amplificación por PCR.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron empleando la ADN polimerasa *High Fidelity* (Roche) siguiendo las recomendaciones proporcionadas por la casa comercial y utilizando el equipo de PCR 9700 (Applied Biosystems).

2.2. Obtención de pUAS \cdot attB \cdot HA.

La secuencia de HA triplicada (HAX3) clonada en pBlueScript KS (pBS) (donado por J. Culí) se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos para añadir las secuencias de corte de las endonucleasas NotI en 5' y XbaI en 3' (NotI \cdot HA 5' y XbaI \cdot HA 3'; Tabla M3) y se clonó en el vector pUAS \cdot attB (Bischof y cols., 2007) en las dianas NotI/XbaI de su *polylinker*.

2.3. Mutagénesis dirigida.

Las mutagénesis dirigidas se realizaron según el método del *Quick Change Mutagenesis* (Stratagene) siguiendo el siguiente esquema:

Mut.	Construcción	Molde	Oligonucleótidos
1	pBS \cdot caup ^{S60/A}	pBS \cdot caup	caup ^{S60/A} 5' caup ^{S60/A} 3'
2	pBS \cdot caup ^{T597/A}	pBS \cdot caup	caup ^{T597/A} 5' caup ^{T597/A} 3'
3	pBS \cdot caup ^{S60/A\cdotT597/A}	pBS \cdot caup ^{S60/A}	caup ^{T597/A} 5' caup ^{T597/A} 3'
4	pBS \cdot caup ^{S60/A\cdotT601/A}	pBS \cdot caup ^{S60/A}	caup ^{T601/A} 5' caup ^{T601/A} 3'
5	pBS \cdot caup ^{T597/A\cdotT601/A}	pBS \cdot caup ^{T597/A}	caup ^{T601/A} 5' caup ^{T601/A} 3'
6	pBS \cdot caup ^{S60/A\cdotT597/A\cdotT601/A}	pBS \cdot caup ^{T597/A\cdotT601/A}	caup ^{S60/A} 5' caup ^{S60/A} 3'
7	pBS \cdot caup ^{T597/D\cdotT601/D}	pBS \cdot caup ^{WT}	caup ^{T597T601/DD} 5' caup ^{T597T601/DD} 3'
8	pAc \cdot caup ^{S60/A\cdotT473/A\cdotS534/A\cdotT597/A\cdotT601/A\cdotHA}	pAc \cdot caup ^{S60/A\cdotT597/A\cdotT601/A\cdotHA}	caup ^{T473/A} 5' caup ^{T473/A} 3'
9	pAc \cdot caup ^{S60/A\cdotT473/A\cdotS534/A\cdotT597/A\cdotT601/A\cdotHA}	pAc \cdot caup ^{S60/A\cdotT473/A\cdotT597/A\cdotT601/A\cdotHA}	caup ^{S534/A} 5' caup ^{S534/A} 3'

Tabla M2. Esquema de las mutagénesis puntuales de *caup*.

2.4. Obtención de las construcciones pUAS-Caup·HA y pUAS-Caup^{mutantes}·HA.

Los ADNc de *caup* y *caup*^{mutantes} del 1 al 7 (1133 pb) clonados en pBS·KS (Tabla M2) se amplificaron por PCR con oligonucleótidos diseñados para añadir dianas de la endonucleasa NotI en 5' y en 3' (Not·*caup* 5' y Not·*caup* 3'; Tabla M3). Los productos de PCR se introdujeron en el vector pGEM·T Easy (Promega). Por último, se digirieron con NotI y se clonaron en la diana NotI del *polylinker* de pUAS^{attB}·HA anteriormente descrito. La orientación de cada evento de ligación se comprobó mediante digestión con la enzima BglII.

Los plásmidos *caup*^{mutantes} 8 y 9 se digirieron con EcoRI y XbaI obteniendo así los fragmentos de ADN correspondientes a *caup*^{4A}·HAx3 y *caup*^{5A}·HAx3 que se clonaron en pUAS^{attB} en las dianas EcoRI/XbaI de su *polylinker*.

2.5. Obtención de las construcciones pAc·caup·HA y pAc·caup^{mutantes}·HA.

Se obtuvieron los fragmentos *caup*·HA y *caup*^{mutantes}·HA del 1 al 7 a partir de sus respectivas construcciones pUAS^{attB}·HA mediante digestión con las endonucleasas EcoRI y XbaI y se clonaron en el plásmido pAc5.1/V5-His B (Invitrogen) en las dianas EcoRI y XbaI de su *polylinker*.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
Not· <i>caup</i> 5'	GCG GCC GCC AGC GAG ACA ATG GCT GC
Not· <i>caup</i> 3'	GCG GCC GCC GAC CCG GAA CGC CC
NotI·HA 5'	GCG GCC GCA ATG GCG CGCTAC CC
XbaI·HA 3'	TCT AGA CTA CAC CAT GCT AGC GTA ATCT
<i>caup</i> S60/A 5'	CTG CCG GTC CTCTGG CTC CAG GTG CTGTTT C
<i>caup</i> S60/A 3'	GAA ACA GCA CCT GGA GCC AGA GGA CCG GCA G
<i>caup</i> T473/A 5'	CGC CTG CAA GGC ACC ACC GCC CAC
<i>caup</i> T473/A 3'	GTG GGC GGT GGT GCCTTG CAG GCG
<i>caup</i> S534/A 5'	GGA GCT CGG TGC GCC GCT GAG TAT G
<i>caup</i> S534/A 3'	CAT ACT CAG CGG CGC ACC GAG CTC C
<i>caup</i> S546/A 5'	CTA CGC CGG CGG AGC GCC ATA TTC GC
<i>caup</i> S546/A 3'	GCG AAT ATG GCG CTC CGC CGG CGT AG
<i>caup</i> T597/A 5'	GAT CCA GCC CGATGCTCC GCC CCA GAC
<i>caup</i> T597/A 3'	GTC TGG GGC GGA GCA TCG GGCTGG ATC
<i>caup</i> T601/A 5'	CTC CGC CCC AGG CAC CAC CCA CTA TG
<i>caup</i> T601/A 3'	CAT AGT GGGTGGTGC CTG GGG CGG AG
<i>caup</i> T597T601/DD 5'	GAT CCA GCC CGATGATCC GCC CCA GGA CCC ACC CACTAT G
<i>caup</i> T597T601/DD 3'	CAT AGT GGGTGG GTC CTG GGG CGG ATC ATC GGG CTG GAT C
<i>caup</i> 1891 3'	GAT CCA TTT GAT GGT GCT GCA GC

Tabla M3. Lista de oligonucleótidos utilizados para los clonajes y mutagénesis.

2.6. Secuenciación de las construcciones.

Se verificaron cada una de las construcciones mediante secuenciación en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. El análisis de los cromatogramas obtenidos en la secuenciación se realizó con el programa Seqman 4.0 (Dnastar).

Cada ADN secuenciado se purificó previamente mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). Se incubó al ADN 10 min en hielo en una solución PEG 8000 (6.5%), NaCl 0,8M. Posteriormente se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m. a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70% a 4 °C. Se dejó evaporar el etanol antes de resuspender el ADN en 60 µl H₂O a una concentración aproximada de 200ng/µl.

2.7. Generación de sondas de ARN.

Se sintetizaron sondas de ARN antisentido marcadas con digoxigenina con el *DIG RNA Labeling Kit* (Roche).

La sonda de *rho* se generó a partir del ADNc completo clonado en pBS-SK (cedido por S. González-Crespo). Se linearizaron 1,5µg de ADN con HindIII y se utilizó la T3 ARN polimerasa para la reacción de transcripción. El ARN obtenido se resuspendió en 150 µl de solución de hibridación con ADN de salmón (100 µg/ml) (SH).

La sonda de *dap/p21* se sintetizó a partir del ADNc completo (1092 pb) clonado en pOT2 (clon LP07247 de *Drosophila Genome Resource Center*). Se linearizaron 1,5 µg de ADN con EcoRI y se utilizó la SP6 ARN polimerasa para la transcripción. El ARN obtenido se resuspendió en 150 µl de SH.

La sonda de *cycE* se obtuvo a partir del ADNc parcial correspondiente al extremo 5' (2,6 Kb) clonado en pT3T719U (cedido por H. Richardson). Se linearizaron 1,5 µg de ADN con BamHI y se utilizó la T3 ARN polimerasa para la transcripción. El ARN obtenido se resuspendió en 700 µl de SH.

3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA.

3.1. Cultivo de células.

Las células de *Drosophila* S2 (Schneider2) se cultivaron a 25 °C en medio X-Press (Gibco) enriquecido con suero fetal de ternera (FCS) al 7%.

Las células S2-Tor^DEgfr (Vinos and Freeman, 2000) se mantuvieron en las mismas condiciones que las células S2 con 400 µg/ml del antibiótico G-418 (Sigma Aldrich).

3.2. Transfección de células.

Para transfectar se utilizaron células crecidas en placas p100 hasta un 80% de confluencia y el sistema de electroporación *Amaza Cell Line Nucleofector Kit V* (Lonza).

Cada transfección se realizó con 2×10^6 células contadas en cámara de Neubauer y 2 µg de ADN plasmídico (pAc·caup·HA o pAc·caup^{5A}·HA). Las células transfectadas se incubaron 48 h en placas multipocillo p12 a 25 °C.

3.3. Tratamientos celulares.

Los distintos tratamientos de las células transfectadas transitoriamente se realizaron a las 48 h de la transfección.

Con el fin de activar la vía de MAPK en las células S2-Tor^DEgfr se indujo la expresión del Egfr constitutivamente dimerizado mediante adición al medio de CuSO₄ (300 µM).

Con el objetivo de inhibir la actividad de MEK (MAP Kinasa Kinasa) se trataron las células con 50 µM de PD98059 (Calbiochem) durante dos horas a 25 °C. Para inhibir la actividad de p38 MAPK se trataron las células con 50 µM de SB203580 (Calbiochem) durante dos horas a 25 °C.

En algunos casos tratamos las células con inhibidores de fosfatasa durante dos horas antes de lisarlas. Utilizamos el inhibidor de Thr/Ser fosfatasa Calyculin A (0,5 µM) (Santa Cruz Biotechnology) y el inhibidor de Tyr fosfatasa NaVO₄ (100 µM) y 30 µM de H₂O₂.

3.4. Extracción de proteínas.

Para los experimentos de inmunoprecipitación se lisaron las células S2 en 200 µl de tampón RIPA (50 mM Tris pH 7,4; 1% NP-40; 150mM NaCl; 0,25% Deoxicolato sódico; 1mM EDTA) con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 200 µg/ml; aprotinina 8 µg/ml; benzamidina 10 µg/ml e inhibidor de Tripsina 10 µg/ml) y los inhibidores de fosfatasa NaVO₄ 1mM (Sigma) y NaF 25mM durante 90 min a 4 °C en agitación. El lisado se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

En el caso de los experimentos de co-inmunoprecipitación se lisaron las células en 200µl de tampón de lisis de menor estringencia (150mM NaCl; 10mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA; 1mM EGTA pH 8; 0,5% NP40) con inhibidores de proteasas y de fosfatasa a las concentraciones anteriormente citadas.

Para los experimentos de ensayo de movilidad diferencial de proteínas fosforiladas (*Phos-tag*) se lisaron las células en 200 µl de tampón de lisis sin agentes quelantes (50 mM Tris pH 7,4; 0,1% NP-40; 150mM NaCl) con los concentraciones arriba indicadas de inhibidores de proteasas y de fosfatasa.

3.5. Inmunoprecipitación.

El sobrenadante procedente del lisado celular se incubó con 15 µl de proteína A-sefarosa durante 30 min a 4 °C con agitación. Cada muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 2 min a 4 °C y el sobrenadante se incubó con anti-HA (2 µg/ml) (Roche) o anti-cycE (2 µg/ml) (Santa Cruz) durante 16 h a 4 °C con agitación.

Posteriormente, se añadieron 15 µl de proteína G-sefarosa y se incubó 1 h a 4 °C en agitación. Se recogieron los complejos inmunes por centrifugación (5 min a 3000 rpm) y tras descartar el sobrenadante, se lavaron 6 veces en tubos Falcon de 15 ml con 5 ml de tampón de lisis.

3.6. Western-blots.

El análisis proteico mediante *Western-blots* se hizo según el protocolo descrito en Sambrook y cols. (1989). Las proteínas de los extractos celulares se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida 6% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad).

El análisis de la movilidad diferencial de fosfoproteínas se realizó en geles de acrilamida 6% con *Phos-tag* 100 µM (Wako Chemicals). Los geles se prepararon según las especificaciones de la casa comercial. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia húmeda durante 3 horas a 4 °C .

Para la detección de proteínas fosforiladas se utilizó un tampón de bloqueo (TBS 0,1% Tween20) con 3% phosphoBlocker (Cell Biolabs).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-HA (1:5000, Roche), anti-pThr·Pro (1:1000, Cell Signalling) y anti-CycE (1:5000, Santa Cruz). El anticuerpo secundario requerido dependió del método de análisis utilizado: anticuerpos conjugados a HRP (*Horseradish Peroxidase*, Amersham Biosciences) para revelar con ECL (GE Healthcare) y anticuerpos IRDye (LI-COR Biosciences) para revelar con *Odyssey Imaging System* (LI-COR Biosciences).

3.7. Citometría de flujo (FACS).

Se realizó en el servicio de Citometría de Flujo del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en un citómetro de flujo FACS Calibur *Becton Dickinson*.

Cada experimento se llevó a cabo con células disgregadas de 50 a 60 discos de ala de cada uno de los genotipos. Se disecaron las larvas en PBS y los discos se acumularon en PBS a 4°C durante un máximo de dos horas. Se centrifugaron durante 1 min a 5000 rpm y se incubaron en 300 µl de Tripsina-EDTA (Sigma T-4299) con 0,5 µl de Hoechst 33342 (10 mg/ml) (Invitrogen) a 28 °C en oscuridad y con agitación durante 30 a 40 min.

Posteriormente, se disgregaron las células pipeteando suavemente y se añadieron 200 µl de PBS+FBS 1% (Suero Fetal Bovino, Sigma 9665) a 4 °C y se centrifugó cada muestra a 3500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 300 µl de PBS+FBS 1% a 4 °C.

Se utilizó el programa FlowJo 7.5 para el análisis de los datos y modelo de *Dean-Jett-Fox* para el estudio de ciclo celular.

4. MÉTODOS HISTOQUÍMICOS.

4.1. Tinción inmunohistoquímica.

Las tinciones con anticuerpos específicos de discos imaginales se realizaron como se describe en Cubas y cols., (1991). Para algunos casos fue necesario la amplificación de la señal con Tiramida, para lo cual se siguió el mismo protocolo de Cubas y cols. (1991) hasta la incubación durante 1 h con anticuerpo secundario: en estos casos se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados (Jackson ImmunoResearch), previamente preadsorbidos durante toda la noche a 4°C frente a larvas fijadas, diluidos 1:200 en PBT-BSA (*phosphate buffered saline* (PBS) 1X, 0.3% Tween-20, MERCK; 4% seroalbúmina bovina, Sigma). A continuación se incubó el tejido en 500 µl de Vectastain *Elite* ABC (Vector Laboratories) durante 30 min. Se realizaron tres lavados de 10 min en PBT (PBS + 0,3% Tween-20) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:50 de *Fluorophore Tyramide* (PerkinElmer, NEL 701). Por último se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBT.

En el caso de la inmunodetección con anti-dP·Erk se disecaron las larvas en PBS+Paraformaldehído 4% (PBS-PFA) en hielo durante un tiempo máximo de 5 min. Se retiró el PBS-PFA y se incubó 20 min en PBS-PFA nuevo a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 15 min en PBTr (PBS+ 0,3% Triton X100, Sigma). Se deshidrató el tejido mediante incubación durante 5 min en diluciones de etanol al 30%, 50%, 70% en PBS. Se hicieron 2 lavados en metanol absoluto y se mantuvo 16 h en metanol a -20°C. Se rehidrató el tejido mediante incubaciones de 5 min en etanol 70%, 50% y 30% en PBS. Se realizaron tres lavados de 15 min en PBTr y tres lavados de 15 min con PBTr+BSA 1%. Se incubó con el anticuerpo anti-dPERk durante 16 h a 4 °C. La incubación con el anticuerpo secundario se hizo según el protocolo de Cubas y cols., 1991).

Para la detección de ADN en fase replicativa se utilizó el sistema de incorporación de EdU (Click-iT EdU HCS Assays, Invitrogen; basado en Salic y itchison, 2008). Se disecaron un máximo de 18 larvas en medio Insect-XPress (MI) (Lonza). Posteriormente, se incubaron en 100 µl de una solución 1 mM EdU en MI+1% FBS durante 30 a 60 min con agitación a 25 °C. Se fijó el tejido en 400 µl de PBS-PFA 4% durante 1 hora con agitación. Se realizaron 3 lavados de 20 min en PBTr 0,1% y tres de 20 min en PBS+0,1% Triton+BSA 3%. Se incubó con los anticuerpos primarios durante 16 h a 4 °C en PBS+0,1% Triton+BSA 3%.

A continuación se realizaron 3 lavados de 20 min en PBTr 0,1% y tres lavados de 20 min en PBS+0,1% Triton+BSA 3% antes de incubar con el anticuerpo secundario en PBS+0,1% Triton+BSA 3% durante 48 h a 4 °C. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 20 min en PBTr 0,1% y tres de 20 min en PBS+0,1% Triton+BSA 3% antes de incubar durante 30 min en *Click-iT reaction buffer* (preparado en el momento según el protocolo comercial). Finalmente, se realizaron 3 lavados de 20 minutos en PBTr 0.1%.

Anticuerpo	Fuente	Dilución	Referencia
anti-Caup	Rata	1:200	Diez del Corral y cols. , 1999
anti-Casp3 activada	Conejo	1:50	Cell Signaling
anti-CD2-FITC	Conejo	1:50	Santa Cruz
anti-CycE	Conejo	1:50	Santa Cruz
anti-Dap	Ratón	1:4	DSHB
anti-Dl	Ratón	1:3	Cedido por Marc Muskavitch
anti-dP·Erk	Ratón	1:10	Sigma
anti-Elav	Rata	1:100	DSHB
anti-HA	Rata	1:1000	Roche
anti-lamina	Ratón	1:100	DSHB
anti-mpm2	Ratón	1:200	Millipore
anti-PCNA	Ratón	1:50	Santa Cruz
anti-pH3	Conejo	1:200	Upstate Biotechnology
anti-pMad	Conejo	1:100	Cedido por Ginés Morata
anti-Sal	Conejo	1:200	De Celis y cols., 1999

Tabla M3. Lista de anticuerpos primarios utilizados.

Los anticuerpos secundarios unidos a fluoróforo fueron Alexa Fluor 488, 555 y 647 de Molecular Probes. Simultáneamente a la incubación con los anticuerpos secundarios se incubó con faloidina conjugada con TRITC (tetrametilrodamina B isotiocianato, Sigma, 1:200) para visualizar la actina cortical.

En todos los casos el montaje de los disco se hizo en Mowiol (Aldrich).

4.2. Hibridación *in situ*.

Las hibridaciones *in situ* en discos imaginales se realizaron tal como se describe en Cubas y cols. (1991). Las sondas de *rho* y *dap/p21* se usaron a una dilución 1:100 y la sonda de *cycE* a una dilución 1:20 en SH para cada hibridación *in situ*.

Los discos imaginales se montaron en Bálsamo de Canadá (Serva).

5. MÉTODOS DE MICROSCOPIA Y PROCESADO DE IMÁGENES.

5.1. Microscopía óptica.

Las imágenes se tomaron con una cámara DFC425 (Leica) en un microscopio Axiophot (Zeiss).

5.2. Microscopía confocal.

Se utilizaron los equipos del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”: Confocal MicroRadiance acoplado a microscopio vertical Axioskop 2 (Zeiss) o Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).

5.3. Procesado de imágenes.

Las imágenes se procesaron digitalmente con programas de tratamiento de imágenes: Zeiss LSM Image Browser 3.5, Zen (Zeiss), ImageJ 1.41 o Adobe PhotoShop CS2.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa Microsoft Excel 2008. En todos los casos se hizo la prueba de *t-student* no pareada de 2 colas. Se consideraron diferencias significativas con $p < 0,05$.

7. MÉTODOS *IN SILICO*.

Se utilizaron los programas de predicción de sitios de fosforilación NetPhosK 1.0 Server (Blom y cols., 2004) y Networkin 2.0 Beta (Linding y cols., 2007) con la colaboración de A. Pascual García.

ANEXO

```

1  maayaqfgya gyptanqltt antdsqsgghg ggsp1sgtne as1spsggst atgltagpls
61  pgavsqssh aghkg1stsp aedvvggdvp vglssaaqdl psrgsceng rpiitdpvsg
121 qtvscqydp arlaiggyr malpsggvgv gvyggypsn eqnpysigv dnsafyapls
181 npygikdtsp stemsawtsa slqsttgys ydptlaaygy gpnydlaarr knatrestat
241 lkawlsehkk npyptkgeki mlaiitkmtl tqvstwfana rrrlkkenkm twepknktd
301 dddgmmsdde kekdagdggk lsteafdpn qlikse1gka ekevdssgdq kldldrephn
361 lvamrglapy atppgahpmh aayssyaqsh nththphpqq mqhhqqqqqq qqnqqqlqhh
421 qmdqpyyhg gygqeesgef aaqknplsrd cgipvpaskp kiwsvadtaa cktppptaay
481 lgqnfypss adqqlphqpl qqhqqqq1qq lqqqqqhhhh phhhhphhsm elgsp1smms
541 syaggspysr iptayteamg mhlpssssss sstgklp1th ihpapqrvgf peiqpdtpppq
601 tpp1tmkl1ss ggsssssgss hsssmhsvtp vtvasmvnil ysntdsgygh ghshghghgh
661 ghglghghgl ghghghmgvt snaylteggr sgs

```

Figura A1. Secuencia aminoacídica de la proteína Caup. Se señala en morado el homeodominio. Aparecen en naranja los sitios putativos de fosforilación por Erk y p38 MAPK identificados *in silico*.

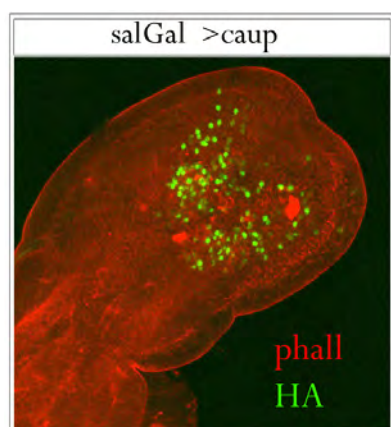


Figura A2. Expresión de Caup-HA a 4h APF bajo el control de salGal4. La sobre-expresión se realizó a 25 °C.

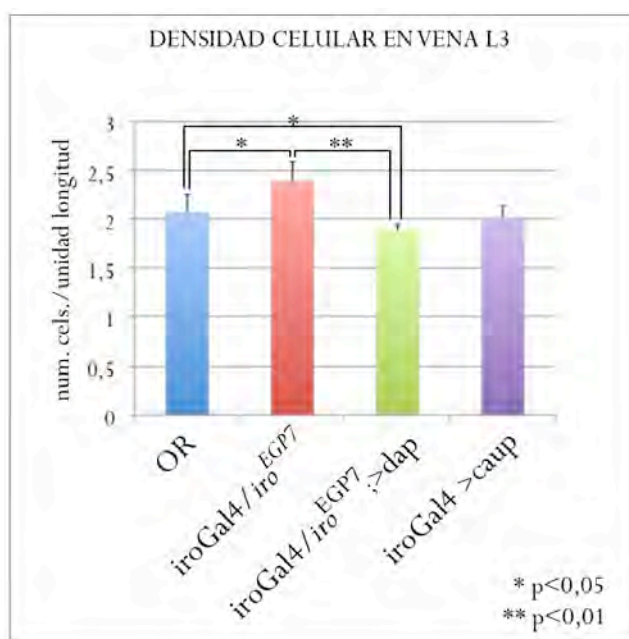


Figura A3. Densidad celular en la vena L3 dorsal en las combinaciones genéticas mostradas. Se analizaron de 5 a 8 venas L3 para cada genotipo.

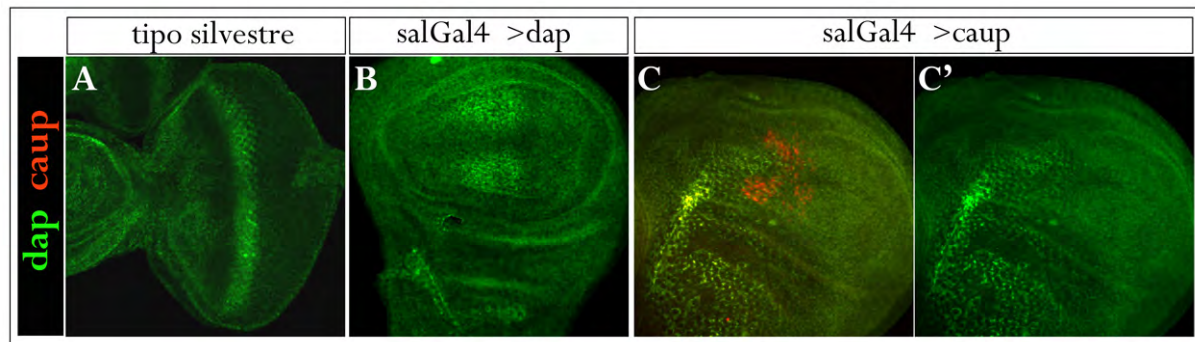


Figura A4. La sobre-expresión de *Caup* no modifica la expresión de *dap* en el disco imaginal de ala. El patrón de expresión en disco de ojo de tipo silvestre (A) y en condiciones de sobre-expresión de *dap* (B) se muestran como control. Las sobre-expresiones se realizaron a 25 °C.

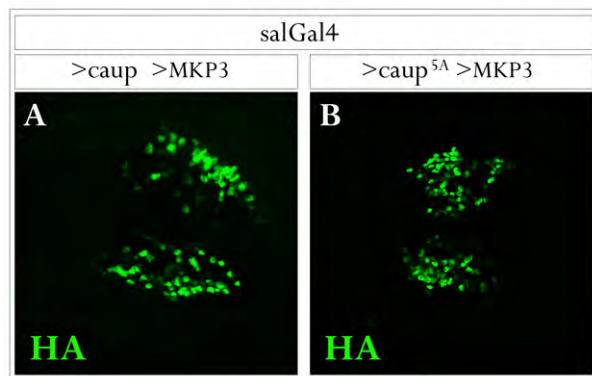


Figura A5. La proteína *Caup*^{5A} se degrada en condiciones de sobre-expresión conjunta de MKP3 de igual forma que la proteína *Caup*.

ABREVIATURAS

>	UAS (<i>upstream activating sequence</i>)
°C	grado centígrado
A	anterior
<i>ac</i>	<i>achaete</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEL	<i>After Egg Laying</i>
Ala	Alanina
<i>ap</i>	<i>apterus</i>
DFP	después de la formación del pupario
<i>ara</i>	<i>araucan</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	seroalbúmina bovina
Casp3*	Caspasa 3 activada
<i>caup</i>	<i>caupolican</i>
C-AS	Complejo <i>achaete/scute</i>
Cdks	quinasas dependientes de ciclina
C-Iro	Complejo <i>Iroquois</i>
CKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CMOS	célula madre del órgano sensorial
cols.	colaboradores
D	dorsal
<i>dap</i>	<i>dacapo</i>
<i>DI</i>	<i>Delta</i>
DP	disco propio
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>egfr</i>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	suero fetal bovino
<i>Flp</i>	<i>Flipase</i>
<i>fng</i>	<i>fringe</i>
FRT	<i>Flipase Recombination Target</i>
GFP	<i>Green Fluorescent proteína</i>
h	horas
HA	hemaglutinina
HD	homeodominio
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
<i>hs</i>	<i>heat-sock</i>
<i>Iro/Irx</i>	genes <i>Iroquois</i> en <i>Drosophila</i> / vertebrados
<i>kni</i>	<i>knirps</i>
<i>kn/col</i>	<i>knot/collier</i>
L1-5	venas longitudinales 1-5
LI-III	primer/tercer estadio larvario
N	Notch

<i>nub</i>	<i>nubbin</i>
<i>Mad</i>	<i>mothers against dpp</i>
MAPK	<i>mitogen activated proteína kinase</i>
min	minutos
<i>mirr</i>	<i>mirr</i>
MKP3	<i>MAPK phosphatase 3</i>
OS	Órgano Sensorial
P	posterior
PBS	phosphate buffered saline
<i>pcna</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polimerase Chain Reaction
phall	faloidina
Pro	Prolina
<i>Rbf</i>	<i>Retinoblastoma</i>
<i>roll</i>	<i>rolled</i>
<i>rho</i>	<i>rhomboid</i>
<i>sal</i>	Complejo <i>spalt / spalt related</i>
<i>sc</i>	<i>scute</i>
Ser	Serina
SH	solución de hibridación
SM	surco morfogenético
<i>stg</i>	<i>string</i>
Thr	Threonina
<i>tkv</i>	<i>thick veins</i>
<i>tub</i>	<i>tubulina</i>
Tyr	Tirosina
V	ventral
<i>Vg</i>	<i>vestigial</i>
<i>vn</i>	<i>vein</i>
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>y</i>	<i>yellow</i>

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K.** (1999a). Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* **400**, 166-169.
- Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. and Matsumoto, K.** (1999b). p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* **19**, 2322-2329.
- Andreu, M. J., Gonzalez-Perez, E., Ajuria, L., Samper, N., Gonzalez-Crespo, S., Campuzano, S. and Jimenez, G.** (2012). Mirror represses pipe expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Development* **139**, 1110-1114.
- Asano, M., Nevins, J. R. and Wharton, R. P.** (1996). Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **10**, 1422-1432.
- Astigarraga, S., Grossman, R., Diaz-Delfin, J., Caelles, C., Paroush, Z. and Jimenez, G.** (2007). A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *Embo J* **26**, 668-677.
- Azpiaz, N. and Morata, G.** (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* **127**, 2685-2693.
- Baig, J., Chanut, F., Kornberg, T. B. and Klebes, A.** (2010). The chromatin-remodeling protein Osa interacts with CyclinE in *Drosophila* eye imaginal discs. *Genetics* **184**, 731-44.
- Baluska, F., Volkmann, D. and Barlow, P. W.** (2004). Eukaryotic cells and their cell bodies: Cell Theory revised. *Ann Bot* **94**, 9-32.
- Bao, Y., Hata, Y., Ikeda, M. and Withanage, K.** (2011). Mammalian Hippo pathway: from development to cancer and beyond. *J Biochem* **149**, 361-79.
- Barsyte-Lovejoy, D., Galanis, A. and Sharrocks, A. D.** (2002). Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. *J Biol Chem* **277**, 9896-9903.
- Basler, K. and Struhl, G.** (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**, 208-214.
- Beadle, G. W. and Tatum, E. L.** (1941). Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**, 499-506.
- Bennett, K. L., Karpenko, M., Lin, M. T., Claus, R., Arab, K., Dyckhoff, G., Plinkert, P., Herpel, E., Smiraglia, D. and Plass, C.** (2008). Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **68**, 4494-4499.
- Bennett, K. L., Romigh, T. and Eng, C.** (2009). Disruption of transforming growth factor-beta signaling by five frequently methylated genes leads to head and neck squamous cell carcinoma pathogenesis. *Cancer Res* **69**, 9301-9305.
- Bienvenu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J. E., Meyer, C. A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G. M., Cole, M. F., Odom, D. T., Odajima, J. et al.** (2010). Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature* **463**, 374-378.
- Biggs, W. H., 3rd, Zavitz, K. H., Dickson, B., van der Straten, A., Brunner, D., Hafen, E. and Zipursky, S. L.** (1994). The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *Embo J* **13**, 1628-1635.

- Billioni, A., Craig, G., Hill, C. and McNeil, H.** (2005). Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14671-14676.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-3317.
- Blair, S. S.** (2003). Lineage compartments in Drosophila. *Curr Biol* **13**, R548-551.
- Blair, S. S.** (2007). Wing Vein Patterning in Drosophila and Analysis of Intracellular Signaling. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 293-319.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. and Zavortink, M.** (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of Drosophila. *Development* **120**, 1805-1815.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-1649.
- Bodenmiller, B., Malmstrom, J., Gerrits, B., Campbell, D., Lam, H., Schmidt, A., Rinner, O., Mueller, L. N., Shannon, P. T., Pedrioli, P. G., Panse, C., Lee HK, Schlapbach, R. and Aebersold, R.** (2007). PhosphoPep a phosphoproteome resource for systems biology research in Drosophila Kc167 cells. *Mol Syst Biol* **3**, 139.
- Bossuyt, W., De Geest, N., Aerts, S., Leenaerts, I., Marynen, P. and Hassan, B. A.** (2009). The atonal proneural transcription factor links differentiation and tumor formation in Drosophila. *PLoS Biol* **7**, e40.
- Brentrup, D., Lerch, H., Jackle, H. and Noll, M.** (2000). Regulation of Drosophila wing vein patterning: net encodes a bHLH protein repressing rhomboid and is repressed by rhomboid-dependent Egr signalling. *Development* **127**, 4729-4741.
- Brower, D. L. and Jaffe, S. M.** (1989). Requirement for integrins during Drosophila wing development. *Nature* **342**, 285-287.
- Brummel, T. J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M. B. and Gelbart, W. M.** (1994). Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in Drosophila. *Cell* **78**, 251-261.
- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W. H., 3rd, Zipursky, S. L. and Hafen, E.** (1994). A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* **76**, 875-888.
- Burglin, T. R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* **25**, 4173-4180.
- Buttitta, L. A., Katzaroff, A. J. and Edgar, B. A.** (2010). A robust cell cycle control mechanism limits E2F-induced proliferation of terminally differentiated cells in vivo. *J Cell Biol* **189**, 981-996.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult Drosophila. *Science* **274**, 252-255.
- Calo, E., Quintero-Estades, J. A., Danielian, P. S., Nedelcu, S., Berman, S. D. and Lees, J. A.** (2010). Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature* **466**, 1110-1114.

- Calvi, B. R., Lilly, M. A. and Spradling, A. C.** (1998). Cell cycle control of chorion gene amplification. *Genes Dev* **12**, 734-744.
- Campuzano, S. and Modolell, J.** (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* **8**, 202-208.
- Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo J* **13**, 4459-4468.
- Carrasco-Rando, M., Tutor, A. S., Prieto-Sanchez, S., Gonzalez-Perez, E., Barrios, N., Letizia, A., Martin, P., Campuzano, S. and Ruiz-Gomez, M.** (2011). *Drosophila* araucan and caupolican integrate intrinsic and signalling inputs for the acquisition by muscle progenitors of the lateral transverse fate. *PLoS Genet* **7**, e1002186.
- Casares, F. and Mann, R. S.** (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* **127**, 1499-1508.
- Cavodeassi, F., Diez Del Corral, R., Campuzano, S. and Dominguez, M.** (1999). Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* **126**, 4933-4942.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Campuzano, S.** (2000). The Iroquois homeobox genes function as dorsal selectors in the *Drosophila* head. *Development* **127**, 1921-1929.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development* **128**, 2847-2855.
- Cavodeassi, F., Rodriguez, I. and Modolell, J.** (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* **129**, 3815-3823.
- Chang, P. J., Hsiao, Y. L., Tien, A. C., Li, Y. C. and Pi, H.** (2008). Negative-feedback regulation of proneural proteins controls the timing of neural precursor division. *Development* **135**, 3021-3030.
- Chao, J. L., Tsai, Y. C., Chiu, S. J. and Sun, Y. H.** (2004). Localized Notch signal acts through eyg and upd to promote global growth in *Drosophila* eye. *Development* **131**, 3839-3847.
- Cho, K. O. and Choi, K. W.** (1998). Fringe is essential for mirror symmetry and morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Nature* **396**, 272-276.
- Choo, K. B.** (2011). Epigenetics in disease and cancer. *Malays J pathol* **33**, 61-70.
- Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M. and Roberts, J. M.** (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* **10**, 1979-1990.
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992). apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* **6**, 715-729.
- Cohen, S. M.** (1993). Imaginal disc development in *The Development of Drosophila melanogaster*, vol I (ed. Bate, M. and Martinez-Arias, A.), pp. 747-841. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cook, O., Biehs, B. and Bier, E.** (2004). brinker and optomotor-blind act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development* **131**, 2113-2124.

- Couso, J. P., Bishop, S. A. and Martinez Arias, A.** (1994). The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* **120**, 621-636.
- Crozatier, M., Glise, B., Khemici, V. and Vincent, A.** (2003). Vein-positioning in the *Drosophila* wing in response to Hh; new roles of Notch signaling. *Mech Dev* **120**, 529-535.
- Crozatier, M., Glise, B. and Vincent, A.** (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser. *Development* **129**, 4261-4269.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. and de Celis, J. F.** (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* **183**, 1005-1026.
- Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. and Modolell, J.** (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev* **5**, 996-1008.
- Culi, J., Martin-Blanco, E. and Modolell, J.** (2001). The EGF receptor and N signalling pathways act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. *Development* **128**, 299-308.
- Culi, J. and Modolell, J.** (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev* **12**, 2036-2047.
- Cully, M., Genevet, A., Warne, P., Treins, C., Liu, T., Bastien, J., Baum, B., Tapon, N., Leever, S. J. and Downward, J.** (2010). A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1. *Mol Cell Biol* **30**, 481-495.
- de Celis, J. F.** (1997). Expression and function of decapentaplegic and thick veins during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1007-1018.
- de Celis, J. F.** (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**, 443-451.
- de Celis, J. F. and Barrio, R.** (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **91**, 31-41.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1996a). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-424.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* **126**, 2653-2662.
- de Celis, J. F., Bray, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1919-1928.
- de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S. J.** (1996b). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-369.
- de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J. and Bray, S. J.** (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* **125**, 4617-4626.
- de la Calle-Mustienes, E., Feijoo, C. G., Manzanares, M., Tena, J. J., Rodriguez-Seguel, E., Letizia, A., Allende, M. L. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2005). A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts. *Genome Res* **15**, 1061-1072.

- de la Calle-Mustienes, E., Glavic, A., Modolell, J. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2002). Xiro homeoproteins coordinate cell cycle exit and primary neuron formation by upregulating neuronal-fate repressors and downregulating the cell-cycle inhibitor XGadd45-gamma. *Mech Dev* **119**, 69-80.
- de Navascues, J.** (2007). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- de Navascues, J. and Modolell, J.** (2007). tailup, a LIM-HD gene, and Iro-C cooperate in Drosophila dorsal mesothorax specification. *Development* **134**, 1779-1788.
- de Nooij, J. C. and Hariharan, I. K.** (1995). Uncoupling cell fate determination from patterned cell division in the Drosophila eye. *Science* **270**, 983-985.
- de Nooij, J. C., Letendre, M. A. and Hariharan, I. K.** (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during Drosophila embryogenesis. *Cell* **87**, 1237-1247.
- Dekanty, A. and Milan, M.** (2011). The interplay between morphogens and tissue growth. *EMBO Rep* **12**, 1003-1010.
- Del Bene, F. and Wittbrodt, J.** (2005). Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 449-460.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila. *Cell* **75**, 741-752.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the Drosophila wing. *Development* **121**, 4215-4225.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Garcia-Bellido, A.** (1990). Behaviour of cells mutant for an EGF receptor homologue of Drosophila in genetic mosaics. *Proc Biol Sci* **242**, 36-44.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gomez-Skarmeta, J.L., Cavodeassi, F. and Modolell, J.** (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in Drosophila. *Genes Dev* **13**, 1754-1761.
- Dominguez, M. and Casares, F.** (2005). Organ specification-growth control connection: new in-sights from the Drosophila eye-antennal disc. *Dev Dyn* **232**, 673-684.
- Dominguez, M. and de Celis, J. F.** (1998). A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the Drosophila eye. *Nature* **396**, 276-278.
- Dominguez, M., Ferres-Marco, D., Gutierrez-Aviño, F. J., Speicher, S. A. and Beneyto, M.** (2004). Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in Drosophila melanogaster. *Nat Genet* **36**, 31-39.
- Du, W. and Dyson, N.** (1999). The role of RBF in the introduction of G1 regulation during Drosophila embryogenesis. *Embo J* **18**, 916-925.
- Du, W., Xie, J. E. and Dyson, N.** (1996). Ectopic expression of dE2F and dDP induces cell proliferation and death in the Drosophila eye. *Embo J* **15**, 3684-3692.
- Duffy, J. B. and Perrimon, N.** (1994). The torso pathway in Drosophila: lessons on receptor tyrosine kinase signaling and pattern formation. *Dev Biol* **166**, 380-395.

- Duronio, R. J., Brook, A., Dyson, N. and O'Farrell, P. H.** (1996). E2F-induced S phase requires cyclin E. *Genes Dev* **10**, 2505-2513.
- Duronio, R. J. and O'Farrell, P. H.** (1995). Developmental control of the G1 to S transition in Drosophila: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* **9**, 1456-1468.
- Eaton, S. and Kornberg, T. B.** (1990). Repression of ci-D in posterior compartments of Drosophila by engrailed. *Genes Dev* **4**, 1068-1077.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the Drosophila embryo. *Cell* **57**, 177-187.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1990). The three postblastoderm cell cycles of Drosophila embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* **62**, 469-480.
- Emmerich, J., Meyer, C. A., de la Cruz, A. F., Edgar, B. A. and Lehner, C. F.** (2004). Cyclin D does not provide essential Cdk4-independent functions in Drosophila. *Genetics* **168**, 867-875.
- Ferres-Marco, D., Gutierrez-Garcia, I., Vallejo, D. M., Bolivar, J., Gutierrez-Avino, F. J. and Dominguez, M.** (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* **439**, 430-436.
- Freeman, M.** (2009). Rhomboids: 7 years of a new protease family. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 231-239.
- Fristrom, D., Gotwals, P., Eaton, S., Kornberg, T. B., Sturtevant, M., Bier, E. and Fristrom, J. W.** (1994). Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of Drosophila. *Development* **120**, 2661-2671.
- Fristrom, D., Wilcox, M. and Fristrom, J.** (1993). The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in Drosophila wing development. *Development* **117**, 509-523.
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B. Z.** (1997). In situ activation of Drosophila EGF receptor pathway during development. *Science* **277**, 1103-1106.
- Garcia-Bellido, A.** (1975). Genetic control of wing disc development in Drosophila. *Ciba Found Symp*, 161-182.
- Garcia-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2222-2226.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of Drosophila. *Nat New Biol* **245**, 251-253.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of Drosophila. *Dev Biol* **48**, 132-147.
- Garcia-Garcia, M. J., Romain, P., Simpson, P. and Modolell, J.** (1999). Different contributions of pannier and wingless to the patterning of the dorsal mesothorax of Drosophila. *Development* **126**, 3523-3532.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S. and Modolell, J.** (2003). Half a century of neural pre-patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci* **4**, 587-598.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferres-Marco, D. and Modolell, J.** (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* **85**, 95-105.

- Gomez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J.** (1996). araucan and caupolican provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* **10**, 2935-2945.
- Gomez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J.** (2002). Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 403-408.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Rodriguez, I., Martinez, C., Culi, J., Ferres-Marco, D., Beamonte, D. and Modolell, J.** (1995). Cis-regulation of achaete and scute: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev* **9**, 1869-1882.
- Gonzalez-Gaitan, M., Capdevila, M. P. and Garcia-Bellido, A.** (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech Dev* **46**, 183-200.
- González-Pérez, E.** (2009). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Grana, X. and Reddy, E. P.** (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* **11**, 211-219.
- Grifoni, D., Garoia, F., Bellosta, P., Parisi, F., De Biase, D., Collina, G., Strand, D., Cavicchi, S. and Pession, A.** (2007). aPKC ζ cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in *Drosophila* and human epithelia. *Oncogene* **26**, 5960-5965.
- Grimm, S. and Pflugfelder, G. O.** (1996). Control of the gene optomotor-blind in *Drosophila* wing development by decapentaplegic and wingless. *Science* **271**, 1601-1604.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. and Calos, M. P.** (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific Integrase from phage ϕ 31. *Genetics* **166**, 1775-1782.
- Guichard, A., Biehs, B., Sturtevant, M. A., Wickline, L., Chacko, J., Howard, K. and Bier, E.** (1999). rhomboid and Star interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during *Drosophila* wing vein development. *Development* **126**, 2663-2676.
- Guo, X., Liu, W., Pan, Y., Ni, P., Ji, J., Guo, L., Zhang, J., Wu, J., Jiang, J., Chen, X. et al.** (2010). Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma. *Oncogene* **29**, 3908-3920.
- Ha Nguyen, H., Takata, R., Akamatsu, S., Shigemizu, D., Tsunoda, T., Furihata, M., Takahashi, A., Kubo, M., Kamatani, N., Ogawa, O. et al.** (2012). IRX4 at 5p15 suppresses prostate cancer growth through the interaction with vitamin D receptor, conferring prostate cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* (en prensa).
- Halder, G. and Johnson, R. L.** (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* **138**, 9-22.
- Halder, G. and Mills, G. B.** (2011). *Drosophila* in cancer research: to boldly go where no one has gone before. *Oncogene* **30**, 4063-4066.
- Han, S. J., Choi, K. Y., Brey, P. T. and Lee, W. J.** (1998a). Molecular cloning and characterization of a *Drosophila* p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 369-374.
- Han, Z. S., Enslen, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I. H., Barrett, T., Davis, R. J. and Ip, Y. T.** (1998b). A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol* **18**, 3527-3539.

- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Hartenstein, V. and Posakony, J. W.** (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389-405.
- Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jia, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A. J. and Paroush, Z.** (2005). EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nat Genet* **37**, 101-105.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-2129.
- Heberlein, U. and Moses, K.** (1995). Mechanisms of *Drosophila* retinal morphogenesis: the virtues of being progressive. *Cell* **81**, 987-990.
- Heberlein, U., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* **75**, 913-926.
- Held, L. I.** (2002). Imaginal Discs: The Genetics and Cellular Logic of Pattern Formation. *Cambridge University Press*.
- Hipfner, D. R. and Cohen, S. M.** (2004). Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 805-815.
- Hsiung, F. and Moses, K.** (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum Mol Genet* **11**, 1207-1214.
- Huppert, S. S., Jacobsen, T. L. and Muskavitch, M. A.** (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* **124**, 3283-3291.
- Ikmi, A., Netter, S. and Coen, D.** (2008). Prepatterning the *Drosophila* notum: the three genes of the iroquois complex play intrinsically distinct roles. *Dev Biol* **317**, 634-648.
- Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K. and Kawabata, M.** (1998). Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Mol Biol Cell* **9**, 2145-2156.
- Irimia, M., Maeso, I. and Garcia-Fernandez, J.** (2008). Convergent evolution of clustering of Iroquois homeobox genes across metazoans. *Mol Biol Evol* **25**, 1521-1525.
- Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* **79**, 595-606.
- Jimenez, G., Guichet, A., Ephrussi, A. and Casanova, J.** (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev* **14**, 224-231.
- Jürgens, G. and Hartenstein, V.** (1993). The terminal regions of the body pattern. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol I (ed. Bate, M. and Martinez-Arias, A.), pp. 687-746. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Johnston, L. A. and Edgar, B. A.** (1998). Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**, 82-84.

- Karess, R. E. and Rubin, G. M.** (1984). Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* **38**, 135-146.
- Kenyon, K. L., Ranade, S. S., Curtiss, J., Mlodzik, M. and Pignoni, F.** (2003). Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the *Drosophila* head. *Dev Cell* **5**, 403-414.
- Kiecker, C. and Lumsden, A.** (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 553-564.
- Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. and Lehner, C. F.** (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**, 107-120.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M.** (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F. and Vaessin, H.** (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87**, 1225-1235.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-393.
- Lee, J. J., von Kessler, D. P., Parks, S. and Beachy, P. A.** (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* **71**, 33-50.
- Lehner, C. F. and O'Farrell, P. H.** (1989). Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* **56**, 957-968.
- Lehner, C. F. and O'Farrell, P. H.** (1990). *Drosophila* cdc2 homologs: a functional homolog is coexpressed with a cognate variant. *Embo J* **9**, 3573-3581.
- Lehner, C. F., Ried, G., Stern, B. and Knoblich, J. A.** (1992). Cyclins and cdc2 kinases in *Drosophila*: genetic analyses in a higher eukaryote. *Ciba Found Symp* **170**, 97-109.
- Letizia, A., Barrio, R. and Campuzano, S.** (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the iroquois genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* **134**, 1337-1346.
- Leyns, L., Gomez-Skarmeta, J. L. and Dambly-Chaudiere, C.** (1996). iroquois: a prepatterning gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech Dev* **59**, 63-72.
- Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., van Vugt, M. A., Jorgensen, C., Miron, I. M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K. et al.** (2007). Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* **129**, 1415-1426.
- Liu, J. L., Buszczak, M. and Gall, J. G.** (2006). Nuclear bodies in the *Drosophila* germinal vesicle. *Chromosome Res* **14**, 465-475.
- Lu, Y., Yu, Y., Zhu, Z., Xu, H., Ji, J., Bu, L., Liu, B., Jiang, H., Lin, Y., Kong, X. et al.** (2005). Identification of a new target region by loss of heterozygosity at 5p15.33 in sporadic gastric carcinomas: genotype and phenotype related. *Cancer Lett* **224**, 329-337.
- Lunde, K., Biehs, B., Nauber, U. and Bier, E.** (1998). The knirps and knirps-related genes organize development of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* **125**, 4145-4154.

- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P. A. and Moses, K.** (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **75**, 927-938.
- Maeso, I., Irimia, M., Tena, J. J., Gonzalez-Perez, E., Tran, D., Ravi, V., Venkatesh, B., Campuzano, S., Gomez-Skarmeta, J. L. and Garcia-Fernandez, J.** (2012). An ancient genomic regulatory block conserved across bilaterians and its dismantling in tetrapods by retrogene replacement. *Genome Res.* (en prensa).
- Martin-Castellanos, C. and Edgar, B. A.** (2002). A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development* **129**, 1003-1013.
- Matsumoto, K., Nishihara, S., Kamimura, M., Shiraishi, T., Otoguro, T., Uehara, M., Maeda, Y., Ogura, K., Lumsden, A. and Ogura, T.** (2004). The prepatterning transcription factor *Irx2*, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nat Neurosci* **7**, 605-612.
- Maurel-Zaffran, C. and Treisman, J. E.** (2000). *pannier* acts upstream of *wingless* to direct dorsal eye disc development in *Drosophila*. *Development* **127**, 1007-1016.
- Mazzoni, E. O., Celik, A., Wernet, M. F., Vasilias, D., Johnston, R. J., Cook, T. A., Pichaud, F. and Desplan, C.** (2008). Iroquois complex genes induce co-expression of rhodopsins in *Drosophila*. *PLoS Biol* **6**, e97.
- McCaffrey, L. M. and Macara, I. G.** (2009). Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001370.
- McCaffrey, L. M. and Macara, I. G.** (2011). Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **21**, 727-35.
- McClure, K. D. and Schubiger, G.** (2005). Developmental analysis and squamous morphogenesis of the peripodial epithelium in *Drosophila* imaginal discs. *Development* **132**, 5033-5042.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-1768.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. and Simon, M. A.** (1997). *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* **11**, 1073-1082.
- Meyer, C. A., Jacobs, H. W., Datar, S. A., Du, W., Edgar, B. A. and Lehner, C. F.** (2000). *Drosophila* Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *Embo J* **19**, 4533-4542.
- Milan, M., Baonza, A. and Garcia-Bellido, A.** (1997a). Wing surface interactions in venation patterning in *Drosophila*. *Mech Dev* **67**, 203-213.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1996a). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11687-11692.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1996b). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 640-645.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997b). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-5696.
- Mohler, J., Seecoomar, M., Agarwal, S., Bier, E. and Hsai, J.** (2000). Activation of *knot* (*kn*) specifies the 3-4 intervein region in the *Drosophila* wing. *Development* **127**, 55-63.

- Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J. and Affolter, M.** (1996). The Drosophila Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development* **122**, 2589-2597.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in Drosophila. *Nature* **255**, 614-617.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1978). Anterior and posterior compartments in the head of Drosophila. *Nature* **274**, 473-474.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1979). Development of the eye-antenna imaginal disc of Drosophila. *Dev Biol* **70**, 355-371.
- Morgan, T. H., Sturtevant, A. H. and Bridge, C. B.** (1920). The Evidence for the Linear Order of the Genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **6**, 162-164.
- Moroy, T. and Geisen, C.** (2004). Cyclin E. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1424-1439.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1997). Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**, 1227-1237.
- Murray, N. R., Kalari, K. R. and Fields, A. P.** (2010). Protein kinase C α expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer. *J Cell Physiol* **226**, 879-87.
- Myrthue, A., Rademacher, B. L., Pittsenbarger, J., Kutyla-Brooks, B., Gantner, M., Qian, D. Z. and Beer, T. M.** (2008). The iroquois homeobox gene 5 is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human prostate cancer and regulates apoptosis and the cell cycle in LNCaP prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **14**, 3562-3570.
- Nellen, D., Affolter, M. and Basler, K.** (1994). Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of Drosophila body pattern by decapentaplegic. *Cell* **78**, 225-237.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-368.
- Nestoras, K., Lee, H. and Mohler, J.** (1997). Role of knot (kn) in wing patterning in Drosophila. *Genetics* **147**, 1203-1212.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. and Edgar, B. A.** (1998). Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. *Cell* **93**, 1183-1193.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. *Development* **124**, 871-880.
- Newfeld, S. J., Chartoff, E. H., Graff, J. M., Melton, D. A. and Gelbart, W. M.** (1996). Mothers against dpp encodes a conserved cytoplasmic protein required in DPP/TGF β responsive cells. *Development* **122**, 2099-2108.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M.** (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-318.
- Noselli, S.** (1998). JNK signaling and morphogenesis in Drosophila. *Trends Genet* **14**, 33-38.
- O'Brochta, D. A. and Bryant, P. J.** (1985). A zone of non-proliferating cells at a lineage restriction boundary in Drosophila. *Nature* **313**, 138-141.

- Oh, H. and Irvine, K. D.** (2009). In vivo analysis of Yorkie phosphorylation sites. *Oncogene* **28**, 1916-1927.
- Padgett, R. W., St Johnston, R. D. and Gelbart, W. M.** (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81-84.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G.** (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* **11**, 961-971.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-912.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* **281**, 2031-2034.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. and Garcia-Bellido, A.** (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-399.
- Pawelcz, N.** (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 72-75.
- Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Wrana, J. L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J. A., Massague, J. and Hoffmann, F. M.** (1994). Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell* **78**, 239-250.
- Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P. et al.** (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep* **3**, 34-8.
- Peterson, J. S., Barkett, M. and McCall, K.** (2003). Stage-specific regulation of caspase activity in *drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **260**, 113-123.
- Phillips, R. G. and Whittle, J. R.** (1993). wingless expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development* **118**, 427-438.
- Pichaud, F. and Casares, F.** (2000). homothorax and iroquois-C genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech Dev* **96**, 15-25.
- Polesello, C., Roch, F., Gobert, V., Haenlin, M. and Waltzer, L.** (2011). Modeling cancers in *Drosophila*. *Prog Mol Biol Transl Sci* **100**, 51-82.
- Posakony, L. G., Raftery, L. A. and Gelbart, W. M.** (1990). Wing formation in *Drosophila melanogaster* requires decapentaplegic gene function along the anterior-posterior compartment boundary. *Mech Dev* **33**, 69-82.
- Rafel, N. and Milan, M.** (2008). Notch signalling coordinates tissue growth and wing fate specification in *Drosophila*. *Development* **135**, 3995-4001.
- Ray, R. P. and Schupbach, T.** (1996). Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **10**, 1711-1723.
- Ready, D. F., Hanson, T. E. and Benzer, S.** (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* **53**, 217-240.
- Rebay, I. and Rubin, G. M.** (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* **81**, 857-866.

- Reifegerste, R. and Moses, K.** (1999). Genetics of epithelial polarity and pattern in the *Drosophila* retina. *Bioessays* **21**, 275-285.
- Roch, F., Baonza, A., Martin-Blanco, E. and Garcia-Bellido, A.** (1998). Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development* **125**, 1823-1832.
- Roch, F., Jimenez, G. and Casanova, J.** (2002). EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins. *Development* **129**, 993-1002.
- Rodriguez-Seguel, E., Alarcon, P. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2009). The *Xenopus* *Irx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Fezf* and *Arx*. *Dev Biol* **329**, 258-268.
- Rogulja, D. and Irvine, K. D.** (2005). Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* **123**, 449-461.
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. R. and Modolell, J.** (1989). Expression of *achaete* and *scute* genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev* **3**, 997-1007.
- Royzman, I., Whittaker, A. J. and Orr-Weaver, T. L.** (1997). Mutations in *Drosophila* DP and E2F distinguish G1-S progression from an associated transcriptional program. *Genes Dev* **11**, 1999-2011.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Ruiz-Gomez, A., Lopez-Varea, A., Molnar, C., de la Calle-Mustienes, E., Ruiz-Gomez, M., Gomez-Skarmeta, J. L. and de Celis, J. F.** (2005). Conserved cross-interactions in *Drosophila* and *Xenopus* between Ras/MAPK signaling and the dual-specificity phosphatase MKP3. *Dev Dyn* **232**, 695-708.
- Ruiz-Gomez, M. and Modolell, J.** (1987). Deletion analysis of the *achaete-scute* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **1**, 1238-1246.
- Salic, A. and Mitchison, T. J.** (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2415-2420.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor*.
- Sauer, K., Knoblich, J. A., Richardson, H. and Lehner, C. F.** (1995). Distinct modes of cyclin E/*cdc2c* kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **9**, 1327-1339.
- Schleiden, M. J.** (1838). Beiträge zur Phyto-genesis. . *Müller's Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* , 136–176
- Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T. and Simcox, A.** (1996). *Vein* is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**, 2302-2313.
- Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M. and Lumsden, A.** (2006). Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development* **133**, 855-864.
- Schwann, T.** (1839). Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen (Verlag der Sander'schen Buchhandlung, Berlin).

- Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C. and Kornberg, T. B.** (1995). Analysis of cubitus interruptus regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development* **121**, 1625-1635.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. and Gelbart, W. M.** (1995). Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1347-1358.
- Simcox, A.** (1997). Differential requirement for EGF-like ligands in *Drosophila* wing development. *Mech Dev* **62**, 41-50.
- Simcox, A. A., Grumblin, G., Schnepf, B., Bennington-Mathias, C., Hersperger, E. and Shearn, A.** (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of vein, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Dev Biol* **177**, 475-489.
- Simpson, P.** (1990). Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* **109**, 509-519.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B.** (1991). Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* **5**, 984-995.
- Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C., Wilson, C., Davis, R. J. and Ip, Y. T.** (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**, 2745-2758.
- Sotillos, S. and de Celis, J. F.** (2006). Regulation of decapentaplegic expression during *Drosophila* wing veins pupal development. *Mech Dev* **123**, 241-251.
- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. and Campuzano, S.** (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* **166**, 549-57.
- Stern, C.** (1954). Two or three bristles. *American Scientist* **42**, 213-247.
- Sturtevant, M. A. and Bier, E.** (1995). Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila*. *Development* **121**, 785-801.
- Sturtevant, M. A., Roark, M. and Bier, E.** (1993). The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev* **7**, 961-973.
- Sukhanova, M. J. and Du, W.** (2008). Control of cell cycle entry and exiting from the second mitotic wave in the *Drosophila* developing eye. *BMC Dev Biol* **8**, 7.
- Suzanne, M., Irie, K., Glise, B., Agnes, F., Mori, E., Matsumoto, K. and Noselli, S.** (1999). The *Drosophila* p38 MAPK pathway is required during oogenesis for egg asymmetric development. *Genes Dev* **13**, 1464-1474.
- Tabata, T., Eaton, S. and Kornberg, T. B.** (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* **6**, 2635-2645.
- Tabata, T. and Kornberg, T. B.** (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**, 89-102.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-3569.

- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. and Tabata, T.** (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.
- Tanoue, T. and Nishida, E.** (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* **93**, 193-202.
- Tapon, N., Harvey, K. F., Bell, D. W., Wahrer, D. C., Schiripo, T. A., Haber, D. A. and Hariharan, I. K.** (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* **110**, 467-478.
- Tena, J. J., Alonso, M. E., de la Calle-Mustienes, E., Splinter, E., de Laat, W., Manzanares, M. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2011). An evolutionarily conserved three-dimensional structure in the vertebrate *Irx* clusters facilitates enhancer sharing and coregulation. *Nat Commun* **2**, 310.
- Usui, K. and Kimura, K.-I.** (1992). Sensory mother cells are selected from among mitotic quiescent clusters of cells in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **116**, 601-610.
- Vervoort, M., Crozatier, M., Valle, D. and Vincent, A.** (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol* **9**, 632-639.
- Villa-Cuesta, E., Gonzalez-Perez, E. and Modolell, J.** (2007). Apposition of *iroquois* expressing and non-expressing cells leads to cell sorting and fold formation in the *Drosophila* imaginal wing disc. *BMC Dev Biol* **7**, 106.
- Villa-Cuesta, E. and Modolell, J.** (2005). Mutual repression between *msh* and *Iro-C* is an essential component of the boundary between body wall and wing in *Drosophila*. *Development* **132**, 4087-4096.
- Vinos, J. and Freeman, M.** (2000). Evidence that *Argos* is an antagonistic ligand of the EGF receptor. *Oncogene* **19**, 3560-3562.
- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-2276.
- Wang, S. L., Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Muller, H. A. and Hay, B. A.** (1999). The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* **98**, 453-463.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-584.
- Wolff, T. and Ready, D. F.** (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* **113**, 841-850.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J. and Pan, D.** (2003). *hippo* encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with *salvador* and *warts*. *Cell* **114**, 445-456.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Hirose, F. and Matsukage, A.** (1995). Distribution of PCNA during postblastoderm cell division cycles in the *Drosophila melanogaster* embryo: effect of a string- mutation. *Cell Struct Funct* **20**, 47-57.

Yang, C. H., Simon, M. A. and McNeill, H. (1999). mirror controls planar polarity and equator formation through repression of fringe expression and through control of cell affinities. *Development* **126**, 5857-5866.

Yu, K., Sturtevant, M. A., Biehs, B., Francois, V., Padgett, R. W., Blackman, R. K. and Bier, E. (1996). The Drosophila decapentaplegic and short gastrulation genes function antagonistically during adult wing vein development. *Development* **122**, 4033-4044.

Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. *Development* **121**, 2265-2278.

Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-844.

Zecca, M. and Struhl, G. (2002a). Control of growth and patterning of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-1376.

Zecca, M. and Struhl, G. (2002b). Subdivision of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-1368.

Zhao, B., Li, L. and Guan, K. L. (2010). Hippo signaling at a glance. *J Cell Sci* **123**, 400-406.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L. et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* **21**, 2747-2761.

APÉNDICE

Regulación cruzada entre los genes del Complejo Iroquois.

Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A.)
Trabajo de iniciación en Biología del Desarrollo
Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid
Mayo 2008

NATALIA BARRIOS LÓPEZ

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster

Regulación transcripcional

Elementos reguladores en *cis*

Autorregulación y regulación cruzada

El complejo *Iroquois*

El control de la expresión de los genes del complejo *Iroquois*

MATERIAL Y MÉTODOS

Estirpes de *Drosophila*

Análisis clonal

Inmunodetección en tejidos

Hibridación *in situ*

RESULTADOS

mirr, regulador de la expresión de *ara/caup*

ara y *caup* necesitan *Mirr* para su expresión en el notum presuntivo

Mirr activa la expresión de *Ara/Caup*

mirr induce la expresión dirigida por los *enhancers* *IroRE*¹ e *IroRE*²

mirr se expresa en territorio de vena presuntiva en discos *iro*^{DFM3}

¿Se regulan *ara* y *caup* entre sí?

DISCUSIÓN

Un mecanismo de refuerzo de la expresión del C-*Iro*

Mirr también parece ser capaz de controlar la expresión mediada por *iroRE*^{L3}

Posible papel de la regulación cruzada de los genes de C-*Iro*.

INTRODUCCIÓN

Los organismos pluricelulares se forman a partir de una única célula la cual se va dividiendo y da lugar a células con diferente capacidad para desempeñar cada una de las funciones vitales que requieren los organismos para sobrevivir. Así estas células se especializan para permitir el movimiento, la percepción del medio, el mantenimiento de la estructura, la reproducción, etc.

Este proceso es posible gracias a que las células embrionarias, inicialmente equivalentes, activarán distintos grupos de genes, cuyos productos repercutirán en las interacciones que mantengan los diversos grupos de células entre sí, y esto a su vez generará nuevas diferencias genéticas entre ellas. Así irán adquiriendo progresivamente sus propiedades funcionales últimas.

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster posee un plan de desarrollo homometábolo en tres fases: la embriogénesis, el periodo larvario y el periodo pupal durante el cual se produce la metamorfosis. Durante la embriogénesis se especifican los primordios o discos imaginales, que crecen durante el periodo larvario hasta que en la metamorfosis evierten, se fusionan con los discos vecinos dando lugar a la mayor parte de la epidermis y exoesqueleto de la mosca adulta. Cada disco recibe su nombre de acuerdo a la estructura que va a formar en el adulto (Fig 1).

A lo largo del desarrollo, en los discos imaginales, se forman dominios de células que asumen un determinado “estado de actividad génica” que viene determinado por la expresión diferencial de numerosos factores de transcripción. Estos crean nuevas subdivisiones en el territorio inicial que finalmente se traducen en la generación de áreas de células que darán lugar a las diferentes partes de una estructura, un tejido o un órgano.

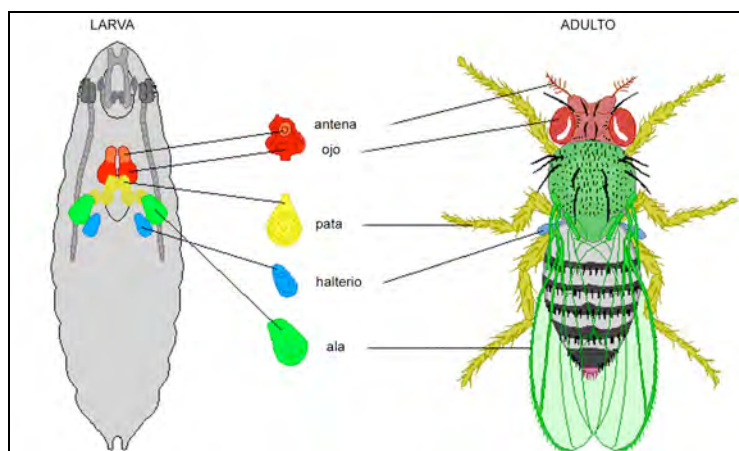


Fig1. Representación esquemática de los discos imaginales larvares y de las correspondientes estructuras epiteliales en la mosca adulta.

Regulación transcripcional

Elementos reguladores en *cis*.

La progresión de la formación de este patrón diferencial de expresión génica se realiza a través unas secuencias no codificantes del genoma denominadas elementos reguladores en *cis* (ERC). Se diferencian dos tipos, *enhancers* o *silencers* según ayuden a incrementar o disminuir respectivamente la expresión de un gen. Estos elementos se encuentran en las regiones flanqueantes, 5' ó 3', del gen que controlan, o bien en sus intrones.

Un ERC contiene sitios de unión para diferentes factores de transcripción y, frecuentemente, más de un sitio de unión para el mismo factor. Esto le permite, por un lado, interpretar el contexto celular en cada momento del desarrollo y, por el otro, variar la intensidad de respuesta según la concentración de los factores.

La importancia de los elementos reguladores queda patente si se considera la cantidad y variedad de procesos que se ejecutan durante el desarrollo con un número relativamente pequeño de vías de señalización. Los ERC garantizan una fina regulación de los genes en los diferentes estadios del desarrollo y en los diferentes territorios del organismo. Además, esta regulación espacio-temporal de la transcripción permite una mayor pleiotropía de las proteínas. Así, dependiendo del momento de desarrollo, o de la región del organismo donde se expresa un gen, una misma proteína intervendrá en funciones aparentemente no relacionadas entre sí.

Un ejemplo de formación de patrón finamente controlado por ERC, es la formación órganos sensoriales en el tórax y ala del adulto de *Drosophila*. La aparición de cada uno de los órganos sensoriales, o quetas, depende de la expresión de los genes proneurales *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*) del complejo *ac-sc* (C-AS) en el disco de ala con un patrón específico (revisado en (Gómez-Skarmeta et al., 2003) el cual se mantiene constante gracias a que diferentes *enhancers* integran la información local que reciben en forma de factores de transcripción, el llamado pre-patrón (Stern, 1954). Así, por ejemplo se ha caracterizado una secuencia de 1,4 kb localizada 5' de gen *ac*, que dirige la expresión de *ac* y *sc* únicamente en un grupo de células en el cual se originarán las células precursoras de las dos quetas dorsocentrales (Gómez-Skarmeta et al., 1995). Este *enhancer* media la actividad de los factores de transcripción *Pannier* y *U-shaped* (García-García et al., 1999) conjuntamente sobre los genes *ac* y *sc*.

Autorregulación y regulación cruzada.

Para conseguir una regulación mucho más fina, en ocasiones, los *enhancers* y promotores tienen la capacidad de interpretar el nivel exacto de expresión del gen sobre el que actúan ya que, poseen sitios de unión para los productos proteicos de dichos genes. De este modo, una proteína puede actuar como moduladora de su propia expresión, llamándose este mecanismo autorregulación (DiNardo, 1988; Hiromi and Gehring, 1987).

En el caso de los complejos génicos como el C-AS se han descrito *enhancers* que controlan la expresión de dos genes dirigiendo así la expresión de éstos en un

mismo tejido y en un mismo momento sin evidencia de regulación cruzada entre los mismos (Gómez-Skarmeta et al., 1995). Los genes *Hox*, en *Drosophila*, están organizados en dos complejos, el complejo *Antenapedia* (Kaufman et al., 1990) y el complejo *Bithorax* (Lewis, 1978). La organización genómica de los complejos *Hox* se caracteriza por un modelo de co-linearidad en el que la posición cromosómica de cada gen se correlaciona con su patrón de expresión en los segmentos corporales que especifica (revisado en (Duboule and Morata, 1994). En estos complejos y en los ortólogos de vertebrados se ha demostrado la existencia de regulación cruzada positiva a través de *enhancers* además del uso de *enhancers* compartidos para especificar sus patrones de expresión solapantes (Gould et al., 1997).

El complejo *Iroquois*.

El complejo *Iroquois* (*C-Iro*) se descubrió mediante una mutagénesis diseñada para identificar mutaciones que alterasen el patrón de quetas (Fig.2) y que, por lo tanto, revelaran genes implicados en la especificación y/o formación del patrón de órganos sensoriales (Fig.2) (Leyns et al., 1996).

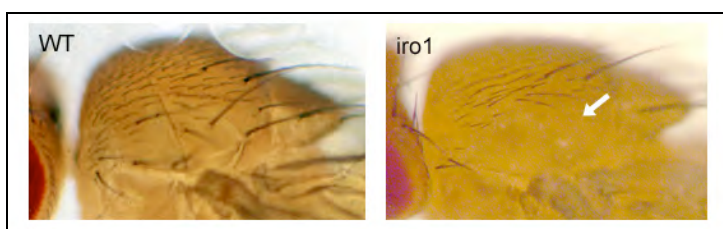
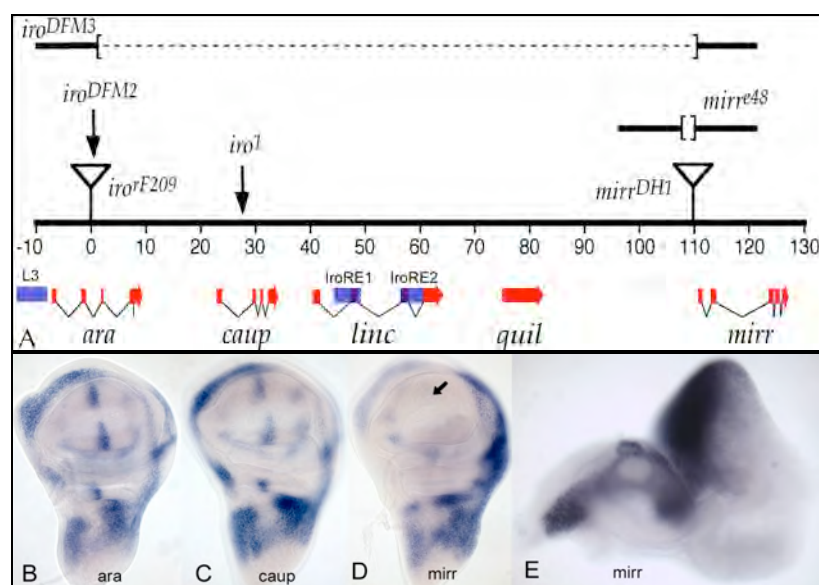


Fig.2 Patrón de quetas en una mosca silvestre (izquierda) y una mosca mutante *iro*¹ (derecha). La falta de función del *C-Iro* causa la pérdida de las quetas laterales en el adulto (flecha).

El *C-Iro* comprende cinco unidades de transcripción: *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*), *lincyan* (*linc*), *quilapan* (*quil*) y *mirror* (*mirr*) (Fig.3A) {Gómez-Skarmeta, 1996 #3500; McNeill, 1997 #3926; R. Díez del Corral, tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1998}. *linc* y *quil* no codifican para proteínas funcionales (E. González-Pérez, sin publicar). Por el contrario *Ara*, *Caup* y *Mirr* son factores de transcripción (homeoproteínas) que desempeñan diferentes funciones a lo largo del desarrollo (revisado en (Cavodeassi et al., 2001). Tempranamente, la expresión del *C-Iro* es necesaria para especificar destino de notum (Díez del Corral et al., 1999), del ojo y cápsula cefálica dorsal (Cavodeassi et al., 1999; Díez del Corral et al., 1999; McNeill et al., 1997). Más tardíamente, *C-Iro* se requiere, entre otras funciones, en el notum para conferir una identidad lateral (Grillenzoni et al., 1998) y para el desarrollo de los órganos sensoriales ahí localizados y en la región del ala para la diferenciación de venas {Gómez-Skarmeta, 1996 #3500}.

Las funciones tempranas y tardías de estos genes se correlacionan con sus patrones de expresión. Los genes *ara* y *caup* muestran un patrón de expresión casi idéntico en el embrión y en los discos imaginales (Gómez-Skarmeta et al., 1996) (Fig. 3B, C y D). Sin embargo, *mirr* tiene un patrón de expresión más divergente al de los otros dos componentes del complejo. Concretamente, en el disco de ala, la expresión de

los tres genes empieza a detectarse a partir del segundo estadio larvario en el territorio presuntivo de notum (Diez del Corral et al., 1999; Gómez-Skarmeta et al., 1996). Más adelante, en el tercer estadio larvario, la expresión de *ara*, *caup* y *mirr* se restringe al notum lateral y aparece en algunos territorios de ala, con la diferencia de que *ara* y *caup* aparecen en la vena presuntiva L1, L3 y L5, mientras *mirr* sólo lo hace en el territorio de vena L1 (Fig.3B-D). En el disco de ojo-antena los tres genes presentan el mismo patrón de expresión en la región dorsal (Fig.3E).



y el supuesto enhancer de vena L3. (B-E) Patrón de expresión de *ara* (B), *caup* (C), y *mirr* (D) en el disco de ala y de *mirr* en disco de antena-ojo (E) en tercer estadio larvario. La principal diferencia en sus patrones de expresión es que *mirr* no se expresa en vena L3 (flecha,D).

Control de la expresión de los genes del C-Iro.

Las proteínas codificadas por los genes del C-Iro son esenciales, entre otras funciones para la especificación de notum (Diez del Corral et al., 1999; Gómez-Skarmeta and Modolell, 1996). Se ha demostrado que en la región presuntiva de notum del disco de ala el C-Iro está bajo el control de la vías de señalización EGFR (Epidermal growth factor receptor) y Dpp (Decapentaplegic) (Cavodeassi et al., 2002; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002). Las señales de ambas vías convergen en al menos dos enhancers, IroRE¹ e IroRE² (Fig. 3A) (Letizia et al., 2007). Estos dos elementos reguladores dirigen la expresión en dos dominios complementarios de la región prospectiva de notum (Fig. 4). Se ha postulado que pueden actuar simultáneamente sobre *ara*, *caup* y *mirr* (Gómez-Skarmeta et al., 1996; Letizia et al., 2007), ya que anteriormente ya se había propuesto (R. Diez del Corral, tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1998) que la coincidencia en el patrón de expresión de los tres genes en el notum no podía atribuirse a regulación cruzada. De hecho, en discos mutantes *iro*^{DFM2} (alelo nulo para *ara*) (Fig. 3A) la expresión de *caup* no está modificada en la región del notum del disco de ala (Fig 5), con lo se descarta, al menos, una regulación cruzada de *ara* sobre *caup* en esta región (Gómez-Skarmeta et al., 1996).

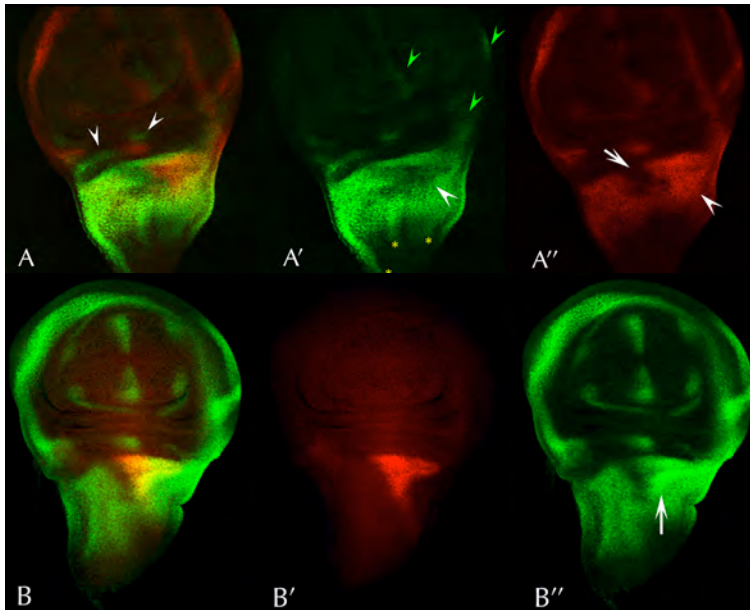


Fig. 4 (A y B) Comparación del patrón de expresión de LacZ mediado por el *enhancer* IroRE¹ (verde) (A) e IroRE² (rojo) (B) en el disco de ala en tercer estadio larvario con el patrón de Ara/Caup (rojo en A, verde en B). (Tomado y modificado de (Letizia et al., 2007).

El patrón de expresión de *ara* en discos mutantes *iro*^{DFM2} (Fig.5) también sugería la existencia de algún *enhancer* de vena L3 (IroRE^{L3}) en 5' de *ara* (Fig. 3A) que regularía la expresión en este territorio tanto de *ara* como de *caup* (Gómez-Skarmeta et al., 1996).

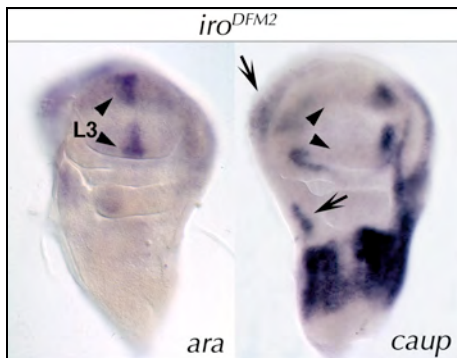


Fig. 5 Alteración del patrón de expresión de *ara* y *caup* en los discos de ala de mutantes *iro*^{DFM2}. La expresión de *ara* se mantiene sólo en el territorio presuntivo de vena L3 (puntas de flecha) mientras que el patrón de *caup* es complementario, faltando sólo en este territorio (Gómez-Skarmeta et al., 1996) (Comparar con expresión silvestre en Fig. 3).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estirpes de *Drosophila*

La mutación *iro*^{DFM3} fue obtenida por movilización con transposasa del elemento P insertado en *iro*^{rF209} (Gómez-Skarmeta et al., 1996; Leyns et al., 1996). *mirr*^{e48} se describe en McNeil y cols. (1997).

Las inserciones marcadoras de actividad transcripcional fueron *IroRE*¹, *IroRE*² (Letizia et al., 2007) e *iro*^{rF209} (Gómez-Skarmeta et al., 1996).

Para la sobreexpresión se emplearon las líneas UAS-*mirr* (McNeill et al., 1997), UAS-*caup*^{II} y UAS *ara*^{III} (J.L. Gómez-Skarmets, no publicados), UAS *ara*³⁶ (Gómez-Skarmeta et al., 1996) y la línea EP154 insertada en *mirr* (Molnar and de Celis, 2006). Se generaron clones de recombinación mitótica utilizando la estirpe *act5C FRT y⁺ FRT Gal4 UAS GFP* (Ito et al., 1997) para los clones de ganancia de función y la línea *ubi-GFP FRT 80B* para los clones de células mutantes (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>).

Análisis clonal

La generación de clones de recombinación mitótica se llevó a cabo mediante la técnica FLP/FRT (Xu and Rubin, 1993). Esta técnica se basa en la expresión de la recombinasa Flipasa (FLP), mediante un promotor inducible por tratamiento a 37°C, que media la recombinación entre dos secuencias diana FRT (*flipase recombinase target*).

Para obtener clones de falta de función se indujo la expresión del trasgén *hs-Flp* por incubación de las larvas en segundo o tercer estadio larvario a 37°C durante 1 hora. Para generar clones de sobreexpresión las larvas, en la edad deseada, fueron incubadas durante 8 – 10 minutos a 37°C.

Inmunodetección en tejidos

Los discos imaginales se disectaron en PBS 1x y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (PPA) durante 20 minutos, y posteriormente en PPA 0,1% desoxicolato sódico y 0,1% Tritón X100. Posteriormente se lavaron en PBS 0,3% Tritón X100 (PBT) y se bloquearon durante 1 hora en PBT-BSA 1%. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C en PBT-BSA 1%. Se realizaron tres lavados en PBT antes de incubar con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo durante 1 hora a temperatura ambiente. El montaje en todos los casos se realizó en Mowiol.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-β-Galactosidasa de conejo (1:20000, Cappel), anti-Caup de rata (1:200) que reconoce también la proteína Araucán (Gómez-Skarmeta et al., 1996). La tinción con faloidina-TRITC se realizó como se describe en Díez del Corral y cols. (1999).

Las imágenes de fluorescencia se tomaron mediante microscopía confocal en un equipo Microradiance (BioRad) acoplado a un microscopio Zeiss Axioskop2 o LSM510 META. Para el procesamiento digital de las imágenes se utilizó el programa Zeiss LSM Image y Adobe Photoshop 7.0.

Hibridación *in situ*

Las hibridaciones *in situ* se realizaron tal como se describe en Cubas et al. (1991). Los discos se montaron en Bálsamo de Canadá y se fotografiaron con una cámara DCF300 (Leica) en un microscopio Axiophot (Zeiss).

RESULTADOS

mirr, regulador de la expresión de *ara/caup*

ara y *caup* necesitan *Mirr* para su expresión en el notum presuntivo.

Análisis previos habían descartado la posibilidad de que los patrones de expresión similares de los genes del *C-Iro* se debieran a una posible regulación cruzada, al menos de *ara* sobre *caup* (Fig. 5) (Gómez-Skarmeta et al., 1996). Sin embargo, no se había explorado un posible papel de *mirr* como regulador de la expresión de *ara* y/o *caup*. Se utilizó el mutante *mirr*^{e48} (McNeill et al., 1997) se indujeron clones en segundo y tercer estadio larvario y se analizó el efecto sobre la expresión de *Ara/Caup*. En la zona presuntiva de notum distal, las células en las cuales se elimina la función de *mirr* pierden la expresión de *Ara/Caup* revelada por la tinción con un anticuerpo anti-*caup* que reconoce ambas proteínas (Fig. 6). Esta falta de *Ara/Caup* se observa incluso en clones pequeños, muy tardíos, lo que descarta la posibilidad de un cambio de destino celular (Diez del Corral et al., 1999). Por otra parte, podemos observar que estos clones del territorio de notum, en los que desaparece la tinción de *Ara/Caup*, presentan un contorno redondeado propio de los clones de falta de función del *C-Iro* (Diez del Corral et al., 1999; Villa-Cuesta et al., 2007). Sin embargo, en el territorio de pleura, los clones *mirr* no son redondeados, y en ellos no desaparece *Ara* ni *Caup* (Fig 6).

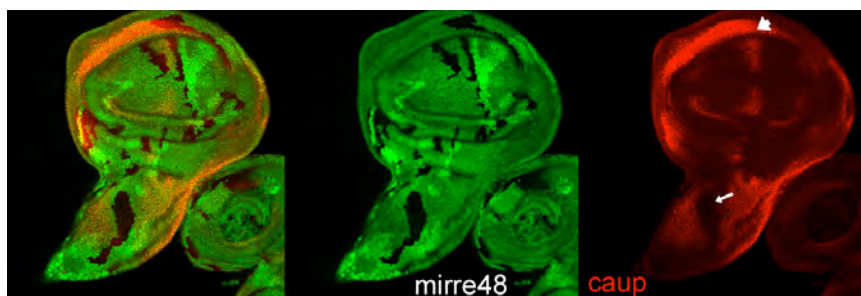


Fig. 6 Clones *mirr*^{e48} (ausencia de verde) en el territorio de notum presuntivo (flecha) pierden la expresión de *ara/caup* (rojo), pero no en la pleura (punta de flecha).

Mirr activa la expresión de *Ara/Caup*.

Habiendo demostrado que *Mirr* es necesario para la expresión de *ara/caup* decidimos comprobar si también era capaz de activarlo ectópicamente. Para analizarlo generamos clones de sobreexpresión de *Mirr* en segundo estadio larvario y examinamos la respuesta de *ara/caup*. En las células donde *mirr* se expresa constitutivamente se observa también una marcada expresión de *Ara/Caup* (Fig.7). La activación ectópica de *Ara/Caup* ocurre en todos los discos estudiados (disco de ala, de ojo, de halterio y de pata) pero no en todo el territorio del disco. Así, por ejemplo, en el territorio presuntivo de ala, la activación ectópica sólo se observa en las proximidades de las zonas de vena (Fig 7A, flecha).

Decidimos realizar el mismo experimento de clones de sobreexpresión de *Mirr* estudiando, esta vez, el efecto que tiene sobre *iro*^{rF209}, inserción en *ara* que dirige la expresión de lac-Z siguiendo el mismo patrón de *ara/caup* (Fig. 3A). En estas células, con ganancia de función de *mirr*, encontramos también una activación ectópica de lac-Z (Fig. 8), lo que indica una regulación de *ara/caup* por *Mirr* a nivel transcripcional.

En conjunto, estos resultados sugieren que *Mirr* podría estar activando la expresión de *ara* y/o *caup*, o que al menos tiene un papel en el mantenimiento de su expresión.

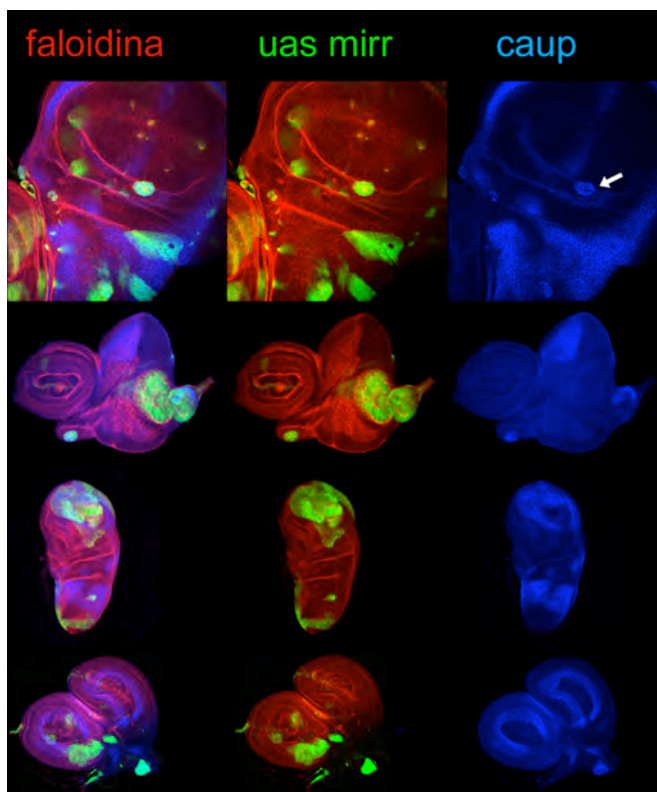


Fig. 7 En clones de sobreexpresión de *Mirr* (verde) se activa ectópicamente la expresión de *Ara/Caup* (azul). (A-D) Disco de ala, de ojo-antena, de halterio, de pata en el mismo orden. En rojo tinción con faloidina.

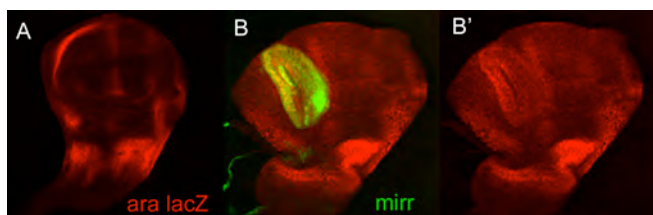


Fig. 8 (A) Expresión de lac-Z de la inserción *iro*^{rF209} (rojo). (B- B') La sobreexpresión de *Mirr* en clones (verde) activa la expresión de lac-Z (rojo) mediada por *iro*^{rF209}.

***mirr* induce la expresión dirigida por los *enhancers* *IroRE*¹ e *IroRE*².**

Letizia y cols. (2007) identificaron diferentes *enhancers* que dirigían la expresión de lac-Z en regiones que reproducen el patrón de expresión de los genes del *C-Iro*. En particular, los *enhancers* *IroRE*¹ e *IroRE*² median la transcripción del gen marcador en la región del notum presuntivo del disco de ala, región en la que *ara*, *caup* y *mirr* comparten su patrón de expresión. Previamente se postuló que este patrón de

expresión similar podía deberse a que diversos *enhancers* actuarían simultáneamente sobre los tres genes (Gómez-Skarmeta et al., 1996).

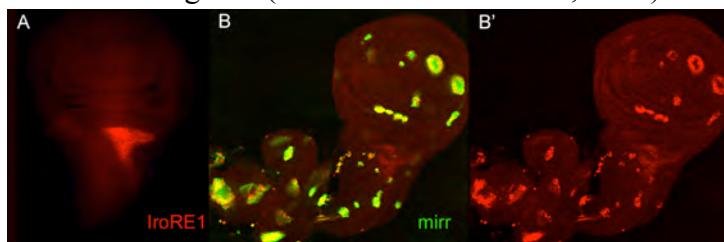


Fig. 9 (A) Expresión del transgén IroRE¹ (rojo). (B-B') Los clones de sobreexpresión de Mirr (verde) expresan lac-Z mediado por IroRE¹ (rojo).

Basándonos en los resultados anteriores, que nos indicaban un posible papel de Mirr como regulador de la expresión de *ara* y *caup*, decidimos analizar la actividad de los *enhancers* IroRE¹ e IroRE² en condiciones de ganancia de función de *mirr*.

Los clones de sobreexpresión de Mirr activan la expresión mediada por IroRE¹ de forma autónoma celular en cualquier parte del disco y en todos los discos estudiados (Fig.9). De la misma forma, el *enhancer* IroRE² responde a la sobreexpresión de Mirr dirigiendo la expresión de lac-Z en el disco de ala (Fig. 10). Sin embargo, en el caso de IroRE² la activación de lac-Z no tiene lugar en todo el territorio del disco y además se observa un comportamiento no autónomo celular (Fig. 10B-B').

Así pues, la respuesta del trasgén *lac-Z* controlada por los elementos IroRE¹ ó IroRE² refleja el comportamiento de *ara/caup* endógenos a la expresión ectópica de *mirr*.

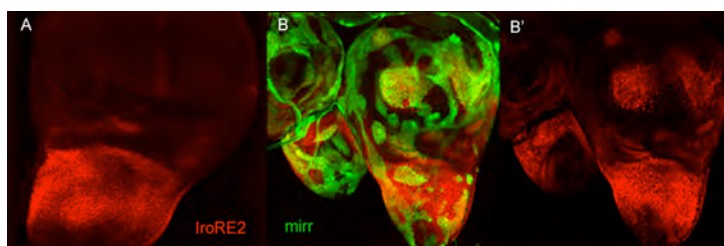


Fig. 10 (A) Expresión del transgén IroRE² (rojo). (B-B') Los clones de sobreexpresión de Mirr (verde) expresan lac-Z mediado por IroRE¹ (rojo) en disco de ala.

***mirr* se expresa en territorio presuntivo de vena en discos *iro*^{DFM3}.**

La deficiencia *iro*^{DFM3} elimina el ADN comprendido entre la inserción en *ara*, *iro*^{rF209}, hasta 100 pb 5' del inicio de transcripción de *mirr* (Fig. 3) (R. Díez del Corral, tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1998). *iro*^{DFM3} no complementa con alelos *mirr* (Kehl et al., 1998) posiblemente porque afecte a su región reguladora, aunque datos de R. Díez del Corral (no publicados) confirman que no es un alelo nulo para *mirr*.

Anteriormente se había observado en el laboratorio (E. González-Pérez, no publicado) un notable incremento de la señal de la tinción con anti-*caup* en clones *iro*^{DFM3} en la región presuntiva de vena L3 del disco de ala (Fig. 11A-A'). Posiblemente, en estas células mutantes *iro*^{DFM3}, *ara* se transcribe dando una proteína Ara truncada no funcional que, sin embargo, es detectada por el anticuerpo anti-*caup*.

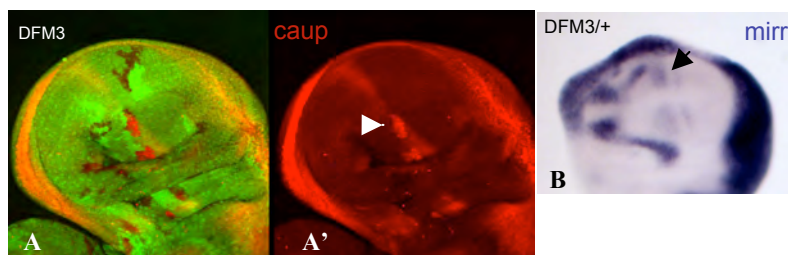


Fig. 11 (A-A') Clones *iro*^{DFM3} (falta de verde). En territorio de vena presuntiva en el disco de ala se observa un aumento de la señal de Ara/Caup (flecha) revelada por el anticuerpo anti-caup (rojo). (B) Hibridación *in situ* con sonda *mirr* de discos de larva heterocigótica *iro*^{DFM3}. Se revela expresión de *mirr* en el territorio de vena presuntiva en el disco de ala (flecha negra).

Decidimos analizar si en las células de clones *iro*^{DFM3} la señal de anti-caup aumentaba por encima de la señal silvestre debido a que *mirr* se expresaba en estas células y aumentaba la transcripción de *ara* truncado. Mediante hibridación *in situ* con sonda *mirr* comprobamos que, efectivamente, *mirr* se expresa en discos de larvas heterocigóticas *iro*^{DFM3} en el territorio presuntivo de vena L3 donde no se expresa en discos silvestres (comparar Fig. 3D y 11B).

Según estos resultados, en las células mutantes *iro*^{DFM3}, *mirr* se expresa en la vena presuntiva L3, y, de acuerdo con nuestros datos anteriores, *Mirr* podría actuar aquí como un activador transcripcional de *ara*.

¿Se regulan *ara* y *caup* entre ellos?

ara y *caup* siempre se expresan conjuntamente en el embrión y en discos imaginales (Gómez-Skarmeta et al., 1996). Puesto que teníamos datos que indicaban un papel de *mirr* como regulador de la expresión de *ara/caup*, quisimos investigar si entre ellos también existe una regulación cruzada y/o autorregulación.

Analizamos la actividad de *iro*^{rF209}, inserto en *ara* (Fig. 3), en condiciones de ganancia de función de *caup*. Los clones de células que sobreexpresan *caup* muestran una bajada en la expresión del transgén lac-Z (Fig. 12). Esta inhibición se observa en disco de ala, pata (Fig. 12C- C') y halterio (no mostrado), siendo en disco de ojo menos notable (no mostrado).

Por otra parte, analizamos la regulación por *caup* y *ara* de la transcripción mediada por los *enhancers* *IroRE*¹ e *IroRE*² (Letizia et al., 2007), los cuales hemos demostrado que responden positivamente a la sobreexpresión de *Mirr* (Fig. 9 y 10). En el caso de la sobreexpresión de *caup*, sólo podemos afirmar, que no modifica la expresión dirigida por *IroRE*¹ (no mostrado). De igual forma, generamos clones de ganancia de función de *ara* en cuyas células tampoco se veía modificada la expresión dirigida por *IroRE*¹ (no mostrado).

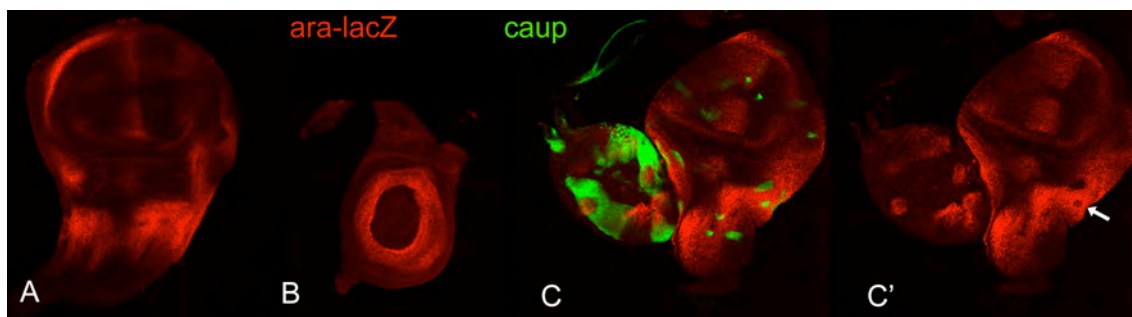


Fig. 12 Expresión de lac-Z de la inserción *iro*^{rF209} (rojo) en disco de ala (A) y disco de pata (B). (C- C') La sobreexpresión de Caup en clones (verde) reprime la expresión de lac-Z (rojo) mediada por *iro*^{rF209}.

Sin embargo, IroRE² sí responde a la sobreexpresión de *ara* y de forma diferente dependiendo del disco. Así, en el disco de ala, en el territorio presuntivo de notum proximal, los clones de ganancia de función de *ara* provocan una disminución en la señal de lac-Z dirigida por IroRE² (Fig. 14C-C'). Por el contrario, en disco de ojo-antena, disco de pata y disco de halterio la sobreexpresión tiene el efecto contrario, provoca un aumento de la expresión de lac-Z dirigida por dicho *enhancer* (Fig 14D-E').

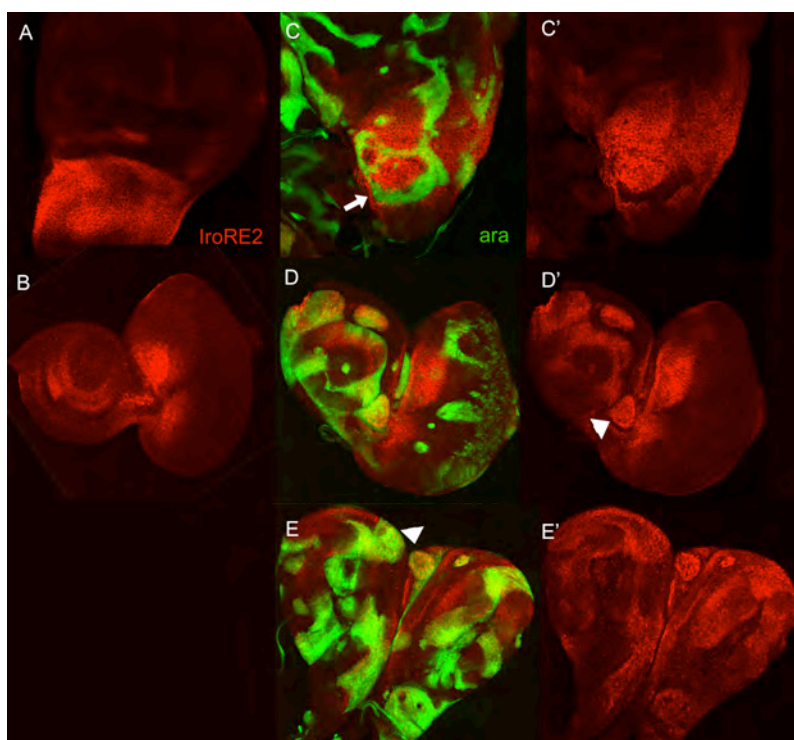


Fig. 14 Expresión del transgén IroRE² (rojo) en disco de ala (A) y disco de ojo-antena (B). (C-C') Los clones de sobreexpresión de Ara (verde) inhiben la expresión de lac-Z mediado por IroRE² en notum proximal del disco de ala (flecha). En disco de ojo-antena (D-D') y disco de pata (E-E') la sobreexpresión de Ara causa la activación de la expresión mediada por IroRE² (puntas de flecha).

En conjunto, podemos concluir que Ara y Caup en condiciones de sobreexpresión son capaces de modificar la expresión dirigida por los *enhancers* que controlan la expresión de *ara* y *caup* en los discos imaginales.

DISCUSIÓN

Con este estudio se ha querido dar un paso más para entender cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión de los genes del *C-Iro*. Se presentan resultados que demuestran que los genes del *C-Iro* además de tener una regulación en *cis* a través de los *enhancers*, también presenta una regulación cruzada en *trans*, posiblemente a través de estos mismos *enhancers*, que podría controlar más finamente la expresión de cada uno de los genes.

Un mecanismo de refuerzo de la expresión del *C-Iro*.

ara y *caup* se expresan con patrones idénticos, mientras *mirr* sólo solapa con éstos parcialmente, lo que sugiere que algunos *enhancers* son comunes para los tres genes. Así, la actividad conjunta de los elementos IroRE¹ e IroRE² reproducen la dinámica espacio-temporal de *ara*, *caup* y *mirr* en el notum presuntivo del disco de ala (Letizia et al., 2007). Nuestros datos sugieren que Mirr podría estar actuando a través de estos *enhancers* para activar o mantener la expresión de *ara* y *caup*. En el experimento de falta de función de Mirr, la expresión de Ara/Caup se pierde incluso en clones muy pequeños (inducidos al principio de tercer estadio larvario) lo que indica que la pérdida de expresión de *ara/caup* no se debe a la transformación de notum en axila alar que no tiene lugar en clones inducidos en este momento del desarrollo (Diez del Corral et al., 1999). El análisis de la secuencia de los elementos IroRE¹ e IroRE² (Fig. 15) sugiere que esta regulación podría ser directa. En IroRE¹ encontramos ocho sitios de unión para las proteínas Iro definidos en (Bilioni et al., 2005), tres de ellos descritos como sitios de alta afinidad. Igualmente, IroRE² contiene siete sitios Iro, siendo uno de ellos de alta afinidad.

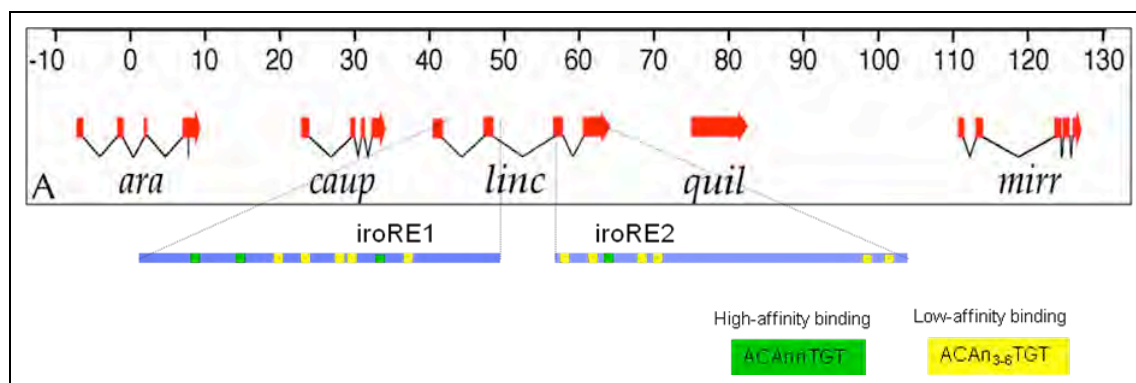


Fig. 15 Mapa del *C-Iro*. Las flechas rojas muestran la posición de los diferentes transcritos. Las barras azules representan los *enhancers* IroRE¹ e IroRE² aumentados desde su localización dentro del complejo. En cada uno de los *enhancers* se esquematizan los sitios de unión para proteínas Iro como cuadrados verdes (alta afinidad) y amarillos (baja afinidad).

La organización de los genes *Iro* de *Drosophila* en un complejo génico se ha conservado hasta vertebrados. En mamíferos y otros vertebrados existen dos complejos (IrxA e IrxB) de tres genes cada uno (Gómez-Skarmeta and Modolell, 2002) que presentan patrones, a menudo, solapantes debido a la acción de *enhancers* compartidos lo que hace innecesario una regulación cruzada (de la Calle-Mustienes et al., 2005). Es interesante que en un caso se ha descrito un fenómeno de regulación cruzada similar al que hemos encontrado en el C-*Iro* de *Drosophila*. En *Xenopus* *Irx1*, *Irx2* e *Irx3* se expresan con el mismo patrón espacio-temporal en las nefronas del embrión. Se ha demostrado que *Irx3* es necesario para la expresión de *Irx1* e *Irx2*, pero no la suya propia (Reggiani et al., 2007). En nuestro modelo (Fig. 16, superior), no podemos discernir si el papel de *Mirr* como activador se lleva a cabo sobre *ara*, o *caup* independientemente; pero según la teoría de los *enhancers* compartidos podríamos pensar en un control conjunto sobre ambos genes. De hecho, podría tratarse también de un sistema de autorregulación a través de *IroRE*¹ e *IroRE*², ya que en el notum *mirr* parece expresarse bajo el control de estos mismos elementos reguladores. Por otro lado, tampoco podemos descartar la existencia de otros *enhancers* diferentes alrededor de *mirr* que dirijan su expresión y que no respondan a la presencia de la proteína *Mirr*.

Según los datos que presentamos, *Ara* y *Caup* también podrían tener un papel en este sistema de autorregulación. Por una parte *Ara* es capaz de alterar la expresión dirigida por *IroRE*¹ e *IroRE*² y por otra, *Caup* inhibe la expresión de *iro*^{rF209}. Pero hay que tener en cuenta que estos resultados se han obtenido en experimentos de sobreexpresión y quizás sean artefactuales. En las células, una cantidad muy alta de proteína ectópica *Ara* o *Caup* podría parasitar los sitios de unión de *Mirr*, uniéndose a *enhancers* a los que en “concentraciones” silvestres no lo haría.

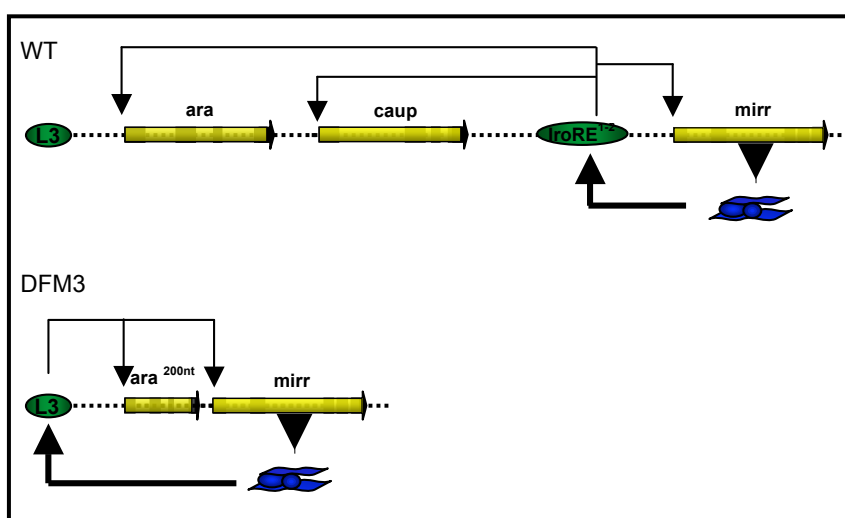


Fig. 16 Modelo de regulación cruzada del C-*Iro*. La expresión de *Ara*, *Caup* y *Mirr* en el notum presuntivo del disco de ala estaría mantenida por el papel activador de la proteína *Mirr* actuando a través de los *enhancers* *IroRE*¹ e *IroRE*² en larvas silvestres (arriba). En larvas heterocigóticas

iro^{DFM3} el *enhancer* de vena L3 es capaz de regular la expresión de *mirr* permitiendo su transcripción en territorio presuntivo de vena L3 (abajo). En estas células *Mirr* actuaría sobre el *enhancer* L3 ya activo para acentuar su actividad.

Mirr también parece ser capaz de controlar la expresión mediada por IroRE^{L3}.

Como ya se indicó en la introducción, a partir de los experimentos de Gómez-Skarmeta y cols. (1996) (Fig. 5) se infiere la existencia de un elemento regulador localizado en 5' de *ara* que controlaría la expresión en territorio de vena L3 tanto de *ara* como de *caup*. Sin embargo, IroRE^{L3} no interviene en la regulación de la expresión de *mirr* probablemente por la existencia de elementos represores o aisladores. En larvas mutantes *Mob*¹ se observa la expresión ectópica de *mirr* en los territorios de tégula, vena L3 y radio dorsal del disco de ala (Kehl et al., 1998). Estos autores localizaron la mutación *Mob*¹ dentro del C-Iro y la describieron como una mutación asociada a la delección de un elemento de tipo represor que en la condición silvestre actuaría sobre *mirr* impidiendo su expresión en dicho territorio

El mutante *iro*^{DFM3} corresponde a una deficiencia que abarca desde el segundo intrón de *ara* hasta 100 pb 5' del inicio de transcripción de *mirr* (Fig. 3). Esta delección podría eliminar elementos represores o aisladores de modo que el *enhancers* iroRE^{L3} puede actuar activando la expresión de *mirr* en vena presuntiva L3 (Fig 11A). En este territorio, según nuestro modelo (Fig. 16, abajo) Mirr actuaría como un activador reforzando la expresión de *ara* truncado a través del *enhancer* IroRE^{L3}. Esta hipótesis se apoya en los resultados obtenidos al realizar clones de la deficiencia *iro*^{EGP7} (E. González-Pérez, no publicados). *iro*^{EGP7} es una delección que comprende la totalidad del C-Iro, desde el tercer exón de *ara* hasta 3' de la unidad transcripcional de *mirr* (Fig. 17A). Se ha observado que en estos clones, que carecen totalmente de Mirr, no se aprecia señal de expresión de *ara* truncado (revelado por el anticuerpo anti-caup), en el territorio de vena presuntiva L3 (Fig. 17B) como ocurre con los clones *iro*^{DFM3}.

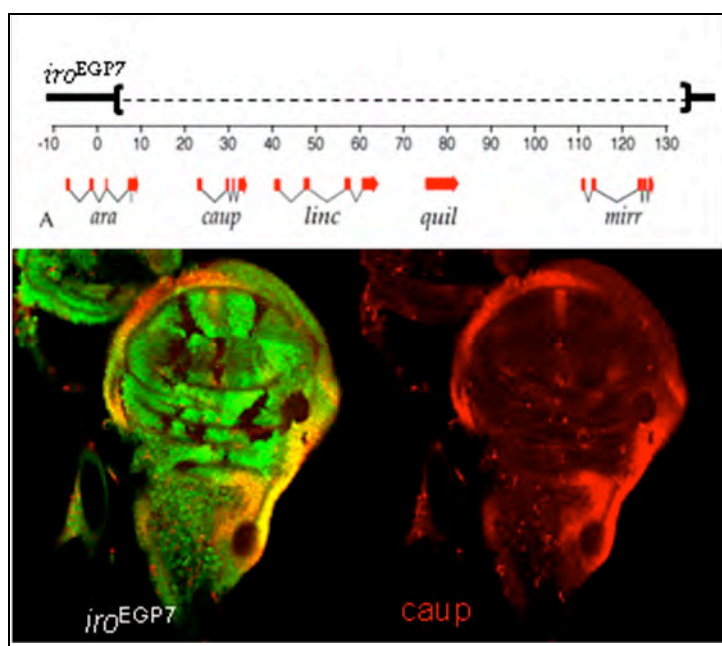


Fig. 17 (A) Mapa genético del C-Iro. Se indica la extensión de la deficiencia *iro*^{EGP7} (E. González-Pérez, sin publicar) Las flechas rojas muestran la posición de los diferentes transcritos del complejo. (B) Clones *iro*^{EGP7} (falta de verde) muestran una pérdida completa de la señal de Ara y Caup revelada por el anticuerpo anti-caup (rojo).

Posible papel de la regulación cruzada de los genes del C-Iro.

Desde *Drosophila* hasta vertebrados, los genes de la familia *Iroquois* presentan, frecuentemente, patrones de expresión compartidos por los genes de un mismo complejo y por los genes parálogos (de la Calle-Mustienes et al., 2005; Letizia et al., 2007) que parecen depender de la actuación de *enhancers* compartidos sobre los que, según nuestros datos y los de Reggiani et al. (2007), en algunos caso actuarían las propias proteínas Iro.

Una cuestión que aún queda por resolver es conocer por qué estos genes deben expresarse conjuntamente. Datos de nuestro laboratorio (E. González-Pérez, no publicados) apuntan a que estos genes podrían tener funciones parcialmente redundantes, y que su actividad se ve alterada por fenómenos dependientes de dosis. Biloni y cols. (2005) demostraron que las proteínas Iro forman heterodímeros y homodímeros *in vitro*. Todo esto sugiere que, quizás, *in vivo* también se formen heterodímeros u homodímeros dependiendo del nivel de expresión de cada uno de los genes implicados. La regulación cruzada, en estos casos parece un sistema perfecto para ajustar en cada momento el nivel de expresión de cada uno los genes que se coexpresan de forma que se sintetizen las cantidades de proteínas requeridas para la formación de los complejos y la activación correcta de los genes diana.

BIBLIOGRAFÍA

- Bilioni, A., Craig, G., Hill, C. and McNeill, H.** (2005). Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14671-6.
- Cavodeassi, F., Diez del Corral, R., Campuzano, S. and Domínguez, M.** (1999). Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* **126**, 4933-4942.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Gómez-Skarmeta, J. L.** (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development* **128**, 2847-2855.
- Cavodeassi, F., Rodríguez, I. and Modolell, J.** (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* **129**, 3815-3823.
- Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. and Modolell, J.** (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* **5**, 996-1008.
- de la Calle-Mustienes, E., Feijoo, C. G., Manzanares, M., Tena, J. J., Rodríguez-Seguel, E., Letizia, A., Allende, M. L. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2005). A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts. *Genome Res* **15**, 1061-72.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gómez-Skarmeta, J. L., Cavodeassi, F. and Modolell, J.** (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **13**, 1754-1761.
- DiNardo, S. S., E; Heemskerk-Jongens, J; Kassis, J.A; O'Farrell, P.H.** (1988). Two-tiered regulation of spatially patterned engrailed gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Nature* **332**, 604-609.
- Duboule, D. and Morata, G.** (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* **10**, 358-64.
- García-García, M. J., Ramain, P., Simpson, P. and Modolell, J.** (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development* **126**, 3523-3532.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S. and Modolell, J.** (2003). Half a century of neural prepatterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 587-598.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferrés-Marcó, D. and Modolell, J.** (1996). *araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* **85**, 95-105.
- Gómez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J.** (1996). *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **10**, 2935-2946.
- Gómez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J.** (2002). Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 403-408.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culí, J., Ferrés-Marcó, M. D., Beamonte, D. and Modolell, J.** (1995). Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev.* **9**, 1869-1882.

- Gould, A., Morrison, A., Sproat, G., White, R. A. H. and Krumlauf, R.** (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping *Hox* expression patterns. *Genes Dev.* **11**, 900-913.
- Grillenzoni, N., van Helden, J., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A.** (1998). The *iroquois* complex controls the somatotopy of *Drosophila* notum mechanosensory projections. *Development* **125**, 3563-3569.
- Hiromi, Y. and Gehring, W. J.** (1987). Regulation and function of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu*. *Cell* **50**, 963-974.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-771.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G.** (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* **27**, 309-62.
- Kehl, B. T., Cho, K. and Choi, K.** (1998). *mirror*, a *Drosophila* homeobox gene in the *iroquois* complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* **125**, 1217-1227.
- Letizia, A., Barrio, R. and Campuzano, S.** (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the *iroquois* genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* **134**, 1337-46.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-70.
- Leyns, L., Gómez-Skarmeta, J. L. and Dambly-Chaudière, C.** (1996). *iroquois*: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **59**, 63-72.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. and Simon, M. A.** (1997). *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorso-ventral border of the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**, 1073-1082.
- Molnar, C. and de Celis, J. F.** (2006). Independent roles of *Drosophila* Moesin in imaginal disc morphogenesis and hedgehog signalling. *Mech Dev* **123**, 337-51.
- Reggiani, L., Raciti, D., Airik, R., Kispert, A. and Brandli, A. W.** (2007). The prepattern transcription factor *Ir3* directs nephron segment identity. *Genes Dev* **21**, 2358-70.
- Stern, C.** (1954). Two or three bristles. *American Scientist* **42**, 213-247.
- Villa-Cuesta, E., Gonzalez-Perez, E. and Modolell, J.** (2007). Apposition of *iroquois* expressing and non-expressing cells leads to cell sorting and fold formation in the *Drosophila* imaginal wing disc. *BMC Dev Biol* **7**, 106.
- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev.* **14**, 2271-2276.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-1368.

Drosophila Araucan and Caupolican Integrate Intrinsic and Signalling Inputs for the Acquisition by Muscle Progenitors of the Lateral Transverse Fate

Marta Carrasco-Rando¹, Antonio S. Tutor¹, Silvia Prieto-Sánchez¹, Esther González-Pérez¹, Natalia Barrios¹, Annalisa Letizia², Paloma Martín¹, Sonsoles Campuzano¹, Mar Ruiz-Gómez^{1*}

¹ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, ² Institut de Biologia Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

Abstract

A central issue of myogenesis is the acquisition of identity by individual muscles. In *Drosophila*, at the time muscle progenitors are singled out, they already express unique combinations of muscle identity genes. This muscle code results from the integration of positional and temporal signalling inputs. Here we identify, by means of loss-of-function and ectopic expression approaches, the Iroquois Complex homeobox genes *araucan* and *caupolican* as novel muscle identity genes that confer lateral transverse muscle identity. The acquisition of this fate requires that Araucan/Caupolican repress other muscle identity genes such as *slouch* and *vestigial*. In addition, we show that Caupolican-dependent *slouch* expression depends on the activation state of the Ras/Mitogen Activated Protein Kinase cascade. This provides a comprehensive insight into the way Iroquois genes integrate in muscle progenitors, signalling inputs that modulate gene expression and protein activity.

Citation: Carrasco-Rando M, Tutor AS, Prieto-Sánchez S, González-Pérez E, Barrios N, et al. (2011) *Drosophila* Araucan and Caupolican Integrate Intrinsic and Signalling Inputs for the Acquisition by Muscle Progenitors of the Lateral Transverse Fate. PLoS Genet 7(7): e1002186. doi:10.1371/journal.pgen.1002186

Editor: Norbert Perrimon, Harvard Medical School and Howard Hughes Medical Institute, United States of America

Received: October 1, 2010; **Accepted:** May 28, 2011; **Published:** July 21, 2011

Copyright: © 2011 Carrasco-Rando et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a JAE-Doc contract to AST; grants BFU2007-62201, BFU2008-03762/BMC, BFU2010-14884/BMC, CSIC/201020E094, and CONSOLIDER CDS2007-00008 from MEC to MR-G and SC; LSHG-CT-2004-511978 from the EC to the Network of Excellence MYORES; and an institutional grant from Fundación Ramón Areces to the CBMSO. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mruiz@cbm.uam.es

Introduction

In *Drosophila* as in vertebrates the proper function of the muscular system relies on the generation of a stereotyped pattern of discrete muscles and their intimate connection with the nervous system, which together control the adequate release of contraction power to fulfil the functional requirements of the organism. The formation of a muscle pattern is therefore of great importance and consequently many efforts have been devoted to solve the central problem of the acquisition of muscle identity. The embryonic *Drosophila* muscle pattern comprises thirty elements in each abdominal hemisegment (Figure 1G). Each muscle is a syncytial fibre whose unique characteristics, i.e., position, size, attachment to tendon cells, innervation and pattern of gene expression allow its unambiguous identification [1,2]. Muscle specification is a stepwise process that ensures the local singling out of a population of myoblasts, the founder myoblasts, each of them containing the necessary information to give rise to a unique muscle. The origin of founder myoblasts can be traced to late embryonic stage 10 when groups of mesodermal cells (the promuscular clusters) start expressing the proneural gene *lethal of scute* and acquire myogenic competence [3]. Opposing activities of Notch and Receptor Tyrosine Kinase signalling pathways ensure that only one cell in the cluster will segregate as a muscle progenitor [4]. This will divide asymmetrically to generate two sibling founder myoblasts or a founder myoblast and an adult muscle precursor [3,5,6]. The

unselected cells of the promuscular clusters, by activation of the Notch signalling pathway, will initiate the expression of the transcriptional regulator Myoblasts incompetent (also called Gleeftul and Lame duck) and become fusion competent myoblasts that by fusing to founders will give rise to multinucleated fibres [7–9]. Regarding muscle identity, each progenitor and founder exhibits a specific code of gene expression that confers to muscles their unique characteristics. The components of these codes are accordingly named muscle identity genes (reviewed in [2,10,11]). The identity code is transmitted to all the nuclei in the syncytium through the process of myoblast fusion [12]. According to their patterns of expression muscle identity genes can be grouped into three categories. Type I includes genes expressed by progenitors and whose expression is maintained in sibling founders and muscles. Examples are *apterous*, *ladybird* (*lb*) and *Pox meso* (*Poxm*) [13–15]. Type II identity genes are expressed in progenitors but differentially regulated in sibling founders, being lost from one of them and the corresponding muscles. Examples are *Krüppel* (*Kr*), *even-skipped* (*eve*), *collier* and *slouch* (*slow*) [3,4,16–18]. And finally type III refers to genes expressed by progenitors and founders of muscles sharing common characteristics. *vestigial* (*vg*), expressed by all internal muscles, is the only known member of this class [12,19]. Regarding the onset of their expression a few muscle identity genes, such as *Kr*, *eve* and *collier*, are already expressed in the promuscular cluster, before the segregation of muscle progenitors [4,16,18,20] whereas other genes, like *Connectin* (*Con*),

Author Summary

In *Drosophila*, as in vertebrates, the muscular system consists of different types of muscles that must act in coordination with the nervous system to control the adequate release of contraction power required for the proper functioning of the organism. Therefore, the acquisition of specific identities by individual muscles is a key step in the generation of the muscular system. In *Drosophila*, muscle progenitors (specific myoblasts that seed the formation of mature muscles) integrate positional and temporal signalling inputs, resulting in the expression of unique combinations of muscle identity genes, which confer on them specific fates. Up to now, very little was known of how this integration takes place at a molecular level and how a particular code is translated into a specific muscle fate. Here we show that the acquisition of the lateral transverse muscle fate requires the repression mediated by Araucan and Caupolican, two homeoproteins of the Iroquois Complex, of other muscle identity genes, like *slouch* and *vestigial*. The repressor or activator function of the Iroquois proteins depends on the activity of the Ras signalling pathway. Therefore, our work places Iroquois genes at a nodal point that integrates signalling inputs and regulates protein activity and cell fate determination.

initiate their expression in already segregated progenitors [4,16,18,20].

In this study we identify *araucan* (*ara*) and *caupolican* (*caup*), two members of the Iroquois gene complex (Iro-C), as novel type III muscle identity genes. The Iro-C genes encode homeoproteins conserved throughout the animal kingdom. They are organized in genomic clusters of three paralogous genes, one in the case of *Drosophila* and usually two in most vertebrates [21]. They participate in a wide variety of developmental processes, mainly related to the specification and patterning of diverse territories of the body, including the lateral mesonotum and dorsal cephalic region of *Drosophila*, the neural ectoderm of *Xenopus* and cranial placode derivatives of zebrafish [22–30]. Here we show by means of genetic approaches that *ara* and *caup* function redundantly in the specification of the lateral transverse (LT) muscles, since in the absence of both genes LT1–4 muscles lose their LT fates and acquire those of other muscles.

At present there is compelling evidence that muscle progenitors can integrate positional and temporal signalling inputs. This promotes the expression of unique combinations of muscle identity genes, which confers on them their ultimate fate [14–18,31,32]. There has been extensive analysis on the regulation of some of these genes, such as *eve* and *collier* [4,33,34], which has allowed to propose candidate cis-regulatory modules for founder muscle specific expression [35]. However, very little is known about how progenitors integrate the activity of the transcription factors encoded by these genes, about the identity of their direct targets (save in the cases of *Kr* and *Lb* [36–38]), and of their hierarchical relationships and their putative post-transcriptional regulation. In this report we have focused on these issues in relation to the function of the *ara/caup* identity genes. We demonstrate that the implementation of the lateral transverse muscle fate requires the repression mediated by Ara/Caup of the muscle identity genes *slou* and *vg*, to avoid reiteration of other muscle fates regulated by these transcription factors. In addition, we identify *slou* as a potential direct target of Ara/Caup. Furthermore, our tissue culture and in vivo experiments show that the repression of *slou* by Ara/Caup in LT precursors requires the activity of the Ras/Mitogen Activated

Protein Kinase (Ras/MAPK) pathway to be kept at a very low level, since otherwise Caup is converted from a repressor to an activator of *slou*. This is to our knowledge the first evidence of the interplay between the Receptor Tyrosine Kinase signalling pathways and the activity of a muscle identity transcription factor. Therefore, during *Drosophila* embryogenesis, and for the acquisition of the lateral transverse muscle fate, the homeoproteins Ara and Caup appear to act at a nodal point in muscle progenitors, as they integrate positional and temporal signalling inputs that modulate their activity on subordinate identity genes.

Results

Expression of Iro-C genes during muscle development

The patterns of expression of *ara* and *caup* in the embryonic ectoderm have been previously reported [39,40]. In this work we focus on the embryonic *ara* and *caup* mesodermal expression. In situ hybridization showed that here both genes were similarly expressed (Figure 1 and results not shown). At early stage 11 *caup* (and *ara*) transcripts and proteins are detected in groups of cells of the presumptive visceral trunk mesoderm (Figure 1A–1A''), the available anti-Caup antibody recognises both Ara and Caup proteins). By mid stage 11 they are expressed at the same dorso-ventral level in the visceral mesoderm and in the dorsolateral ectoderm (Figure 1B–1B''). Expression in the visceral mesoderm declined at late stage 11 when it became detectable in groups of cells of the somatic mesoderm (promuscular clusters [3], Figure 1C and 1C'), from where a subset of muscle progenitors (P) still expressing *ara/caup*, will segregate slightly later (stage 12, Figure 1D). Expression was maintained in sibling founder myoblasts (Fs in Figure 1D') derived from *ara-caup*-expressing progenitors and in the muscles they give rise to (Figure 1E–1E''), namely LT1–4, dorsal transverse 1 (DT1) and segment border muscle (SBM) (Figure 1F and 1G). The expression in the somatic mesoderm of the third member of the Iroquois complex, *mirror* [41] did not overlap with that of *ara-caup* (not shown).

The early expression of *ara/caup* in all lateral muscles with vertical orientation, suggested a possible role as muscle identity genes. Therefore, we compared their expression with that of several muscle identity genes. For the LT1–4 muscles, *ara/caup* were co-expressed with *Kr* in the promuscular clusters from which progenitors P_{LT1/LT2} and P_{LT3/LT4} are singled out (Figure 2A). *ara/caup* expression was maintained at high levels in both progenitors that also express *Kr* (Figure 2B). Whereas *Kr* expression decayed in founders LT1 and LT3 before the onset of myoblast fusion and in LT2 and LT4 muscles from stage 15 onwards [18], expression of *ara/caup* was maintained in the four founders (Figure 2D and 2E). These also expressed *Con*, co-expression that was maintained in the mature LT1–4 muscles (Figure 1G). In the case of muscle DT1, the onset of *ara/caup* expression coincided with that of *Con* and *slou* in the progenitor of DT1 and dorsal oblique 3 (DO3) muscles (Figure 2C) and it appeared to be maintained in DT1 founder (Figure 2E) and mature muscle at low levels (Figure 1G). Finally, *ara/caup* co-expressed with *lb* in the SBM founder (Figure 2D), but were not detected in the *lb*-expressing progenitor and promuscular cluster. In summary, different muscle lineages expressed *ara/caup* at different steps of the myogenic programme (Figure 2F). In the LT1–4 case *ara/caup* and *Kr* were detected at the earliest lineage stage, that is in promuscular clusters, preceding *Con* expression in progenitors (not shown); in the DT1/DO3 lineage *ara/caup* and *slou* were first detected in the already singled out DT1/DO3 progenitor and in the SBM *ara/caup* expression was first detected in the SBM founder after *lb* expression.

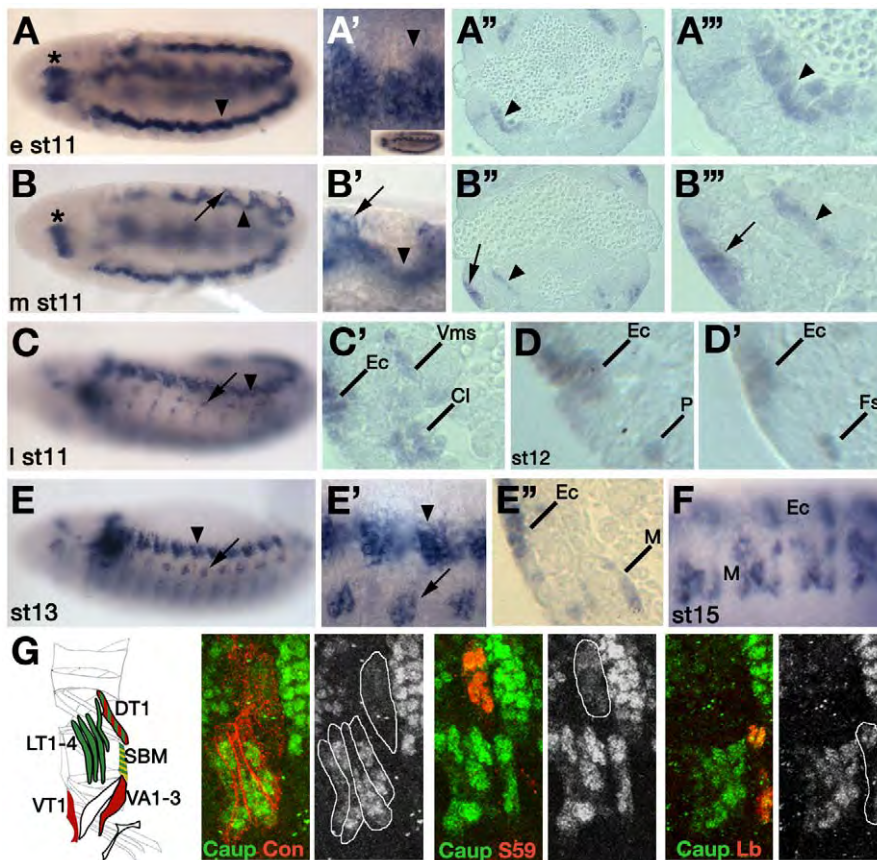


Figure 1. Pattern of expression of *ara* and *caup* during myogenesis. Wild type embryos of the indicated developmental stages were hybridized with *caup* (A, A', B, B', C, E, E') or *ara* (F) riboprobes or sectioned after anti-Caup antibody staining (A', A'', B', B'', C', D, D', E'). (A-A'') *caup* is expressed in the visceral mesoderm at early stage 11 (arrowheads, A and A' show the same embryo with different focus as shown in the inset). (B-B'') At mid stage 11 *caup* is expressed in the visceral mesoderm (arrowheads) and in the lateral ectoderm (arrows). Asterisks in A and B point to the primordium of the proventriculus. A'', B'' close-ups of the images shown in A' and B', respectively. (C-C') Early stage 12/late stage 11 embryos. (C) *caup* is expressed in the lateral ectoderm (arrowhead) and in groups of mesodermal cells (arrow). (C') Cross-section showing *caup* expression in ectodermal cells (Ec), visceral mesoderm (Vms) and promuscular clusters (Cl). (D, D') At stage 12 *caup* is expressed in individual muscle progenitors (P in D) and slightly later in both founders (Fs) derived from the division of progenitors (D'). (E-E'') At stage 13 *Caup* is detected in a lateral stripe of ectodermal cells (arrowheads in E, E', Ec in E'') and in muscle precursors (arrows in E, E', M in E''). (F) Stage 15 embryo showing expression of *ara* in the ectoderm and in mature muscles. (G) Stage 15 embryos double stained with anti-Caup (green) and antibodies against Con, Slou or Ladybird (red). *caup* is co-expressed with *Con* in LT1–4 muscles, with *slou* in DT1 and with *lb* in SBM. The drawing scheme summarises the wild type patterns of expression of *caup* (green), *slou* (red), *lb* (yellow) and *Con* (black contour line) in relation to the wild type complement of abdominal muscles. For muscle nomenclature see [1].

doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g001

Ara and Caup are required for specification of lateral transverse muscles

During imaginal development Ara and Caup can functionally substitute each other in all territories where their function has been investigated [22,23,28]. Thus, to analyse their role in embryonic myogenesis and evaluate the possible contribution of *mirror* to any phenotype we might find, we used three deficiencies: *Df(3L)iro^{DFM3}*, which removes both *ara* and *caup*, (and probably affects *mirror* regulation, [23,28]), *Df(3L)iro^{EGP6}*, which removes *ara* and *caup* without affecting *mirror* and its regulatory region, and *Df(3L)iro^{EGP5}*, which only removes *mirror* [42]. Whereas *Df(3L)iro^{EGP5}* embryos did not show any detectable phenotype in the lateral region (not shown), a distortion of the lateral larval muscle pattern (visualised with antibody MAC141 to Tropomyosin) was found in both *Df(3L)iro^{DFM3}* and *Df(3L)iro^{EGP6}* embryos (Figure 3A–3C). In more than 95% of cases muscles with LT morphology were absent (Figure 3E). Instead, some fibres with abnormal orientation appeared in the lateral and ventral regions, but never inserted at

the LT attachment sites (asterisks in Figure 3B and 3C). The loss of LT muscles was further verified by loss of expression of the specific LT muscle marker *CG13424*, recently renamed *lateral muscles scarcer* (*lms*) [43] at stage 15 and the absence of *Con* expression in the lateral somatic mesoderm (Figure S1). Both DT1 and SBM fibres developed with normal morphologies (Figure 3A–3C and Figure S1). To examine the individual contribution of *ara* and *caup* to the phenotype we resorted to embryos mutant for only one of these genes (*ara* in *ara^{F209}*, [28], or *caup* in *iro^{EGPA1}*, [42]). The larval muscle pattern was normal in both mutants (not shown). Thus, similarly to imaginal development, *ara* and *caup* appear to play redundant roles during embryonic myogenesis.

The absence of muscles with LT morphology in *ara/caup* mutants could be due to a failure of otherwise well specified muscles to find the right insertion to tendon cells, due to ectodermal requirement of *Iro-C* genes, or to a misspecification of the muscles. Two independent results indicated that *Iro-C* genes are required autonomously in the mesoderm to specify the LT fate. First, the

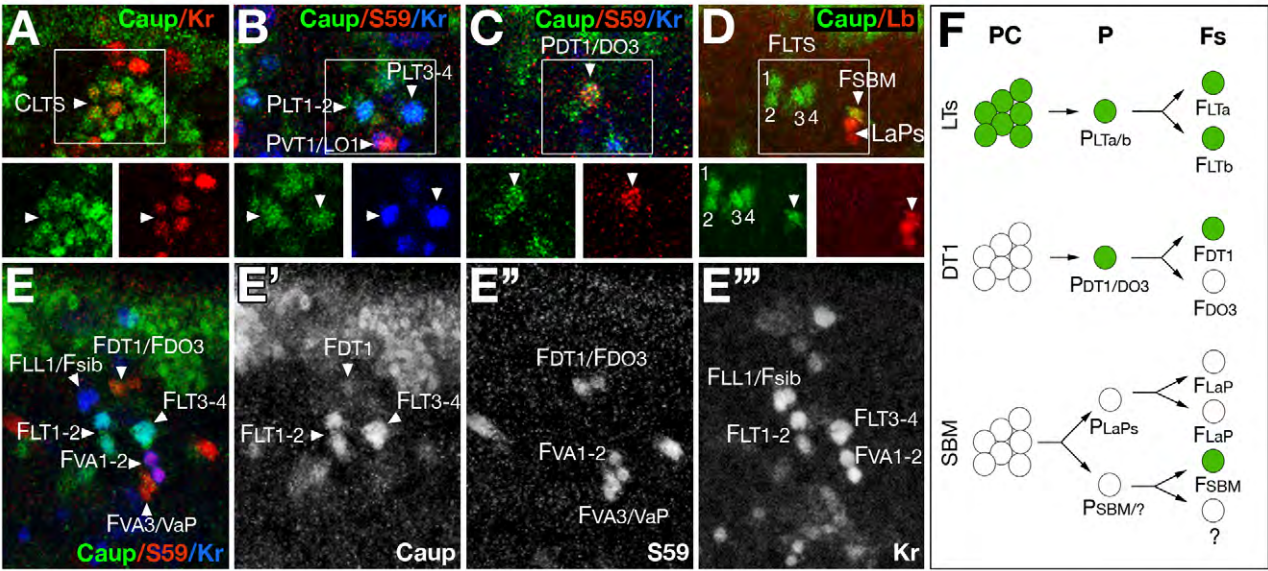


Figure 2. Onset of *Caup* expression in muscles in relation to other muscle identity genes. All images show a detail of an embryonic wild-type abdominal hemisegment stained with antibodies against *Caup* (green) and different muscle identity proteins. Images show a ventral view of the embryo, with the exception of B and C that correspond to lateral views. (A–C) Stage 11 embryos. (A) *caup* and *Kr* (red) are co-expressed in a lateral transverse promuscular cluster (CLTS). (B–C) *caup* is co-expressed with *Kr* (blue) in progenitors of LT muscles (P_{LT1/LT2} and P_{LT3/LT4}, B) and with *slou/S59* (red) in DT1/DO3 progenitor (P_{DT1/DO3}, C). (D) Late stage 12 embryo co-expressing *caup* and *Lb* in the SBM founder (F_{SBM}). (E) Stage 12 embryo showing co-expression of *caup* with *slou/S59* (red) in DT1 founder (F_{DT1}) and with *Kr* (blue) in LTs founders (F_{LT1–4}). The position of LL1, LL1sib and VA1–3 founders (F_{LL1}, F_{LL1sib}, F_{VA1–3}) and the ventral adult muscle precursor are also indicated. (F) Schematic representation of *ara/caup* expression in the LTs, DT1 and SBM lineages (SBM lineage as revised in [17]). LaPs, lateral adult muscle precursors; PC, promuscular cluster; P, muscle progenitor; Fs, founder myoblasts.

doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g002

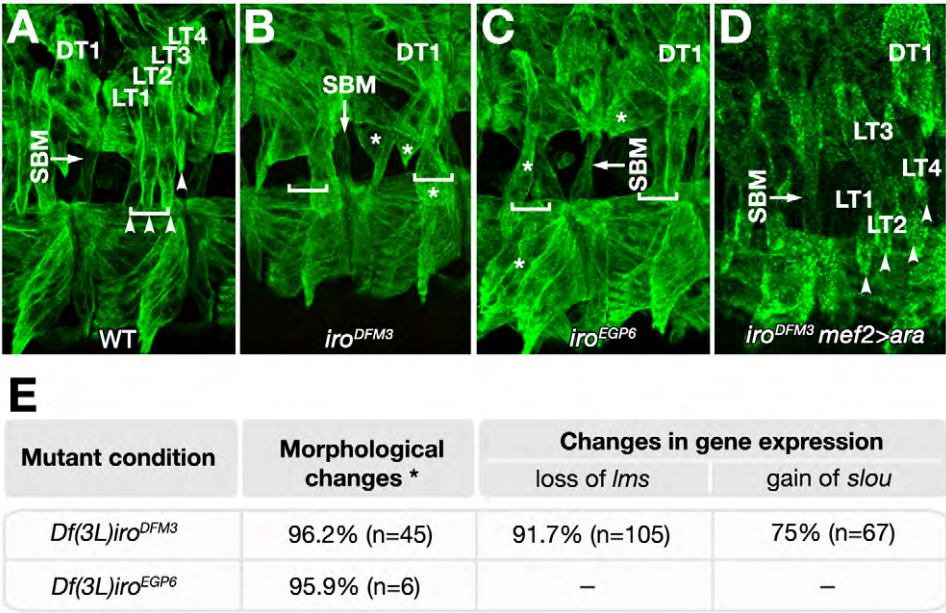


Figure 3. Muscle phenotypes of *Iro-C* mutant embryos. (A–D) Latero-ventral region of stage 16 wild-type (A), *Df(3L)iro^{DFM3}* (B), *Df(3L)iro^{EGP6}* (C) and stage 15 *Df(3L)iro^{DFM3} mef2>ara* (D) embryos stained with anti-Tropomyosin antibody (green). The position of ventral wild-type LT muscle tips and LT attachment sites are marked with arrowheads and brackets, respectively. Note the absence of muscles with LT morphology and insertions at LT attachment sites, and the presence of morphologically normal DT1 and SBM muscles (arrows) in the mutant backgrounds (B, C). Asterisks indicate morphological abnormal latero-ventral muscles in these embryos. This phenotype is rescued by mesodermal *ara* expression with the pan-mesodermal driver *mef2-GAL4* (D). (E) Quantification of phenotypes produced by the loss of *ara/caup* in LT muscles. * Refers to changes in shape, orientation or attachment sites; n, numbers of hemisegments analysed (stages 14–16); –, not determined.

doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g003

normal development of LT muscles in *Df(2L)5* embryos devoid of Iro-C gene expression at the ectoderm (Figure S2 and [44]). And second, the rescue of the muscle phenotype of *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos by Ara supplied exclusively in the mesoderm (using myocyte enhancer factor 2 (*mef2*)-*GAL4* as driver, Figure 3D).

All progenitors and founders segregate in *Df(3L)iro^{EGP6}* mutant embryos

We next examined whether the loss of LT muscles was due to either a failure in the segregation of muscle progenitors (absences and/or duplications) or to an early transformation of the fate of LT progenitors. To discern between these possibilities we combined the reporter line *rP298*, which expresses β -galactosidase in all progenitors and founders [32,45] with *Df(3L)iro^{EGP6}*. We focussed on the previously well-established muscle lineages labelled by *Slou*/S59 [3,17] and the LT1–4 lineages labelled by *Kr* [18]. With these markers in the lateral-ventral region of *rP298* embryos we can identify the following founders (Figure 4A–4A' and insets below). In the dorsalmost lateral mesoderm we find the sibling founders DT1 and DO3 (expressing *slou*) and the lateral longitudinal 1 (LL1) founder and its sibling (expressing *Kr*). Immediately below segregate the four LT founders (expressing *Kr*). And more ventrally appear the sibling ventral acute 1 (VA1) and VA2 founders (which express *Kr* and *slou*) and the VA3 founder and its sibling, the ventral adult precursor (that express *slou*). In *Df(3L)iro^{EGP6}* embryos we observed the same number of identifiable founders (Figure 4B and 4B'). There were however significant differences in terms of patterns of gene expression. Namely, the presumptive LT3–4 founders now expressed *slou* in addition to *Kr* (Figure 4B and 4B' and insets below). This code of muscle identity gene expression is similar to that of VA1 and VA2 founders (Figure 5A), suggesting an early transformation of LT3–4 to VA1–2 muscles.

Ara and Caup implement LT muscle fate by repression of muscle identity genes in progenitors

The absence of all muscles with LT morphology in *ara/caup* mutant embryos prompted us to examine whether, in addition to the putative transformation of LT3–4 towards VA1–2, there was a similar change of fate for LT1–2. LT progenitors express *Kr*, *caup*, *Con* and *lms*, *P_{LL1/LL1sib}* expresses *Kr* and *vg*, and *P_{VA1/2}* *Kr*, *slou*, *Con* and *Poxm* (Figure 5A and 5B). Using a combination of these markers we found in the lateral region of *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos an ectopic muscle that expressed *Kr*+*Vg*, the code of LL1 (LL1*, Figure 5C) and an ectopic muscle VA2 (VA2* in Figure 5E–5G). This change of muscle identity could take place in founders or at the progenitor state. If this were the case, we anticipated that both muscles resulting from sibling founder myoblasts should be duplicated in *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos. Indeed, using anti-*Poxm*, which labels VA1–3 ([14] and Figure 5B), and antibodies to *Kr* and *Slou*, which are maintained only in VA2 (Figure 5B and 5D), we identified two VA2 muscles (that co-express *Poxm* and *Kr*) and two *Poxm*-expressing VA1 muscles in late stage 14 *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos (Figure 5F). The presence of the duplicated VA1 and VA2 muscles was more evident at stage 15 when *Poxm* was only weakly expressed in VA2 muscles (Figure 5G). We concluded that Ara and Caup were required to specify LT progenitors and that implementation of this fate implies the repression of specific muscle identity genes, such as *slou* in *P_{LT3/4}* and *vg* in *P_{LT1/2}*. Moreover, it seemed that the only muscles affected by the lack of *ara/caup* were those in which these genes were already expressed in the corresponding promuscular clusters, since the fate of DT1 and SBM, visualised by the expression of *slou*, *Con* and *lb*, was apparently unaffected in *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos (Figure 2F, Figure 5D and 5E, and Figure S1E–S1H).

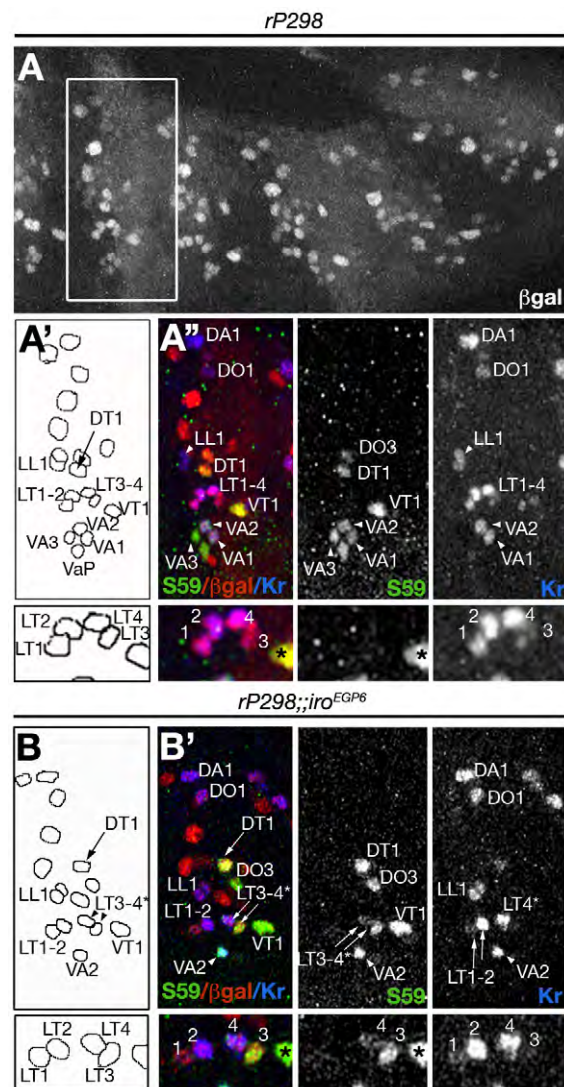


Figure 4. Changes of fate in LT founders of *Iro-C* mutant embryos. (A–B') Late stage 12 control (A–A') and *rP298;Df(3L)iro^{EGP6}* sibling embryos (B, B') stained with anti- β gal (red), anti-*Slou*/S59 (green) and anti-*Kr* (blue) antibodies. β gal staining is used as a marker for founders (*rP298* line) and the white rectangle in A marks the individual segment shown in A', A''. (A', B) Drawings indicating the relative position of the founders visualised in the corresponding (A'', B') confocal images. The founders expressing *Kr* or *slou*/S59 are labelled by their muscle's acronyms. Note that although founder segregation is unaffected in *Df(3L)iro^{EGP6}* embryos, the specification of LT founders is altered (B, B'). Thus, two of the LT founders (LT3–4* in B, B'), marked by expression of *Kr*, also express *slou*/S59, a property exclusive of the VA1–2 founders (see insets below for details of LT founders, the asterisks mark VT1 founder, that expresses *slou*/S59 but not *Kr*. Note that *Kr* is disappearing from LT1 and 3). All panels show Z projections of several consecutive confocal sections with the exception of A'' that corresponds to a combination of two Z projections, one lateral, as the one shown in B', and other rotated ventrally to show VAs founders. For muscle nomenclature other than ventral adult precursor (VaP) see [1]. doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g004

Ras/MAPK cascade modulates the regulation of *slou* by Ara in Schneider-2 cells

Our data suggested that Ara/Caup might act as repressors of *slou* in the *Drosophila* mesoderm. Therefore we decided to investigate whether *slou* might be a direct target of Ara/Caup.

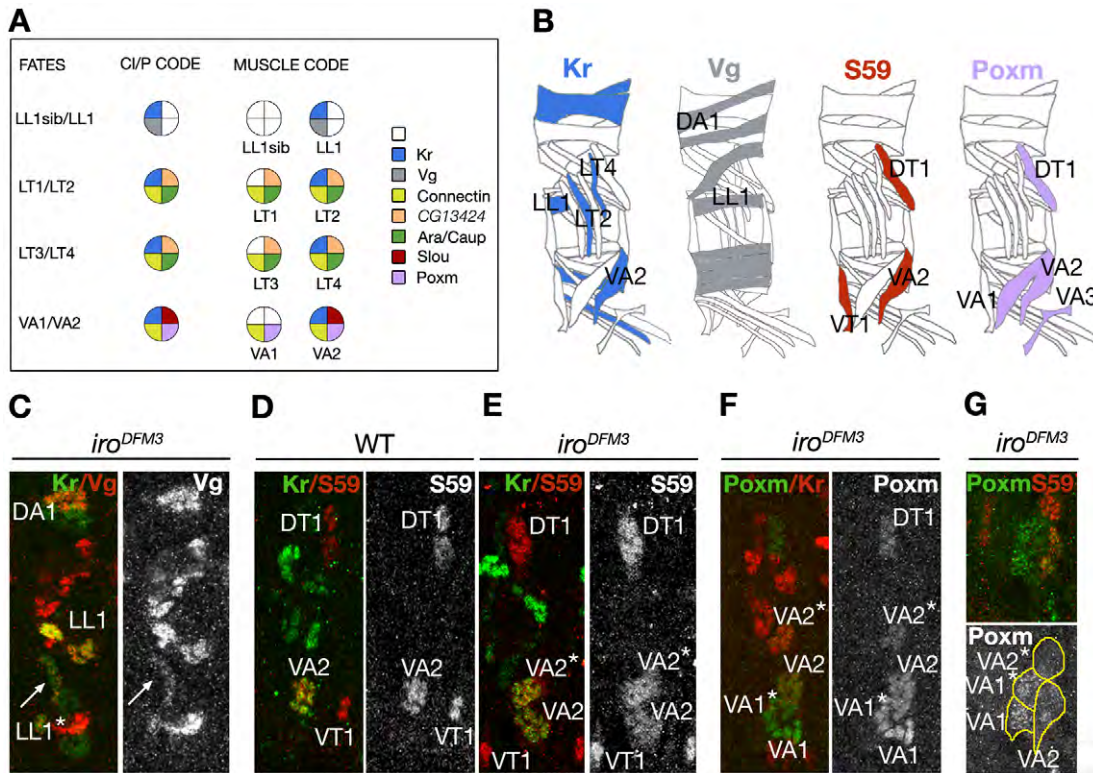


Figure 5. Muscle fate transformations in *Df(3L)iro*^{DFM3} embryos. (A) Summary of identity codes for promuscular clusters (CI), progenitors (P) and muscles missing or duplicated in *ara/caup* mutants, indicated by a colour code. (B) Schematic drawings of the body wall muscles in wild type abdominal hemisegments, depicting the muscles that express the marker indicated on top. (C) Stage 14 *Df(3L)iro*^{DFM3} embryo showing a duplication of LL1 fate in the lateral region, pointed by an arrow (LL1*). As shown in the corresponding schemes, LL1 is the only muscle that co-expresses *Kr* (green) and *vg* (red) in the lateral region. (D, E) Double-staining with anti-*Kr* (green) and anti-*Slou*/*S59* (red) antibodies in stage 14 wild-type (D) and *Df(3L)iro*^{DFM3} (E) embryos, showing duplication of VA2 fate in the mutant embryo that co-expresses *Kr* and *slou*/*S59* (VA2*). (F) At stage 14 two VA2-like muscle precursors expressing *Kr* and *Poxm* and two *Poxm*-expressing VA1-like precursors are observed in *Df(3L)iro*^{DFM3} embryos. (G) The duplicated muscles are clearly visualised at stage 15, when *Poxm* expression is still clear in VA1 but fading in VA2 muscles. Note the presence of two muscles expressing higher levels of *Poxm* (green, VA1 and VA1*) next to two fibres co-expressing low levels of *Poxm* and *slou*/*S59* (red) in a *Df(3L)iro*^{DFM3} embryo.

doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g005

An “in silico” search of a previously reported *slou* cis-regulatory region [46] identified two putative Iro binding sites (BS) at positions +129 (BS1) and −1642 (BS2), relative to the transcription start site, which match the consensus ACAN₂₋₈TGT ([47] and Figure 6A). We cloned this regulatory region in a Luciferase reporter vector and measured Luciferase activity in *Drosophila* Schneider-2 (S2) cells transiently transfected with this construct and increasing amounts of HA-tagged Caup. Contrary to expectations, we found that addition of Caup-HA increased the basal Luciferase activity driven by the *slou* regulatory region in a dose dependent manner (blue bars in Figure 6B), indicating that Caup acts as a transcriptional activator of *slou* under these conditions. The reported regulation of the chicken *Irx2* factor by MAPK (that switches it from repressor to activator) could explain this result [48]. Since Western Blot analysis of S2 lysates using an antibody against diphospho-extracellular-signal related kinase (dpErk) showed the MAPK pathway to be active in S2 cells (Figure 6C) and we have obtained experimental evidence showing the presence of phosphorylated Caup in S2 cells with constitutively active MAPK pathway (N.B. A.S.T and S.C. manuscript in preparation), we hypothesized that the activation effect of Caup in S2 cells could be due to the Ras/MAPK cascade turning Caup from transcriptional repressor into activator. Indeed, the inhibition of the Ras/MAPK pathway by the PD98059 MAP-erk kinase-1 (MEK1) inhibitor induced a Caup-dose dependent decrease in

Luciferase activity driven by the *slou* regulatory sequences (Figure 6B, red bars). This result could not be attributed to a direct effect of the inhibitor over the *slou* promoter, since its addition did not modify the basal Luciferase activity of the construct (Figure 6B).

To test whether Caup-dependent transcriptional regulation relied on a direct interaction of Caup with the *slou* regulatory region we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with in vitro translated Caup and wild-type and mutated Caup-BS. These assays indicate efficient binding of Caup to BS1, which is abolished by BS1 mutation and deletion (Figure 6D). In contrast, Caup appears not to bind BS2 under these experimental conditions (not shown).

Next we examined the functional relevance of BS1 and BS2 in the Luciferase reporter assay. Deletion of BS2 had no major effect on Caup-dependent *luciferase* expression compared to the wild-type promoter (Figure 6E and 6F compare with Figure 6B). This result suggested that Caup does not bind to BS2 (as indicated by the EMSA data). Unexpectedly, deletion of BS1 resulted in a more efficient activation of *luciferase* expression than that driven by the wild type regulatory region (Figure 6E). This suggested that binding of Caup to BS1 somehow impaired transcription. Note that the activation of *luciferase* driven by the BS1 mutated regulatory region was still dependent on the MAPK pathway (Figure 6E and 6F). This suggests that such activation appears to

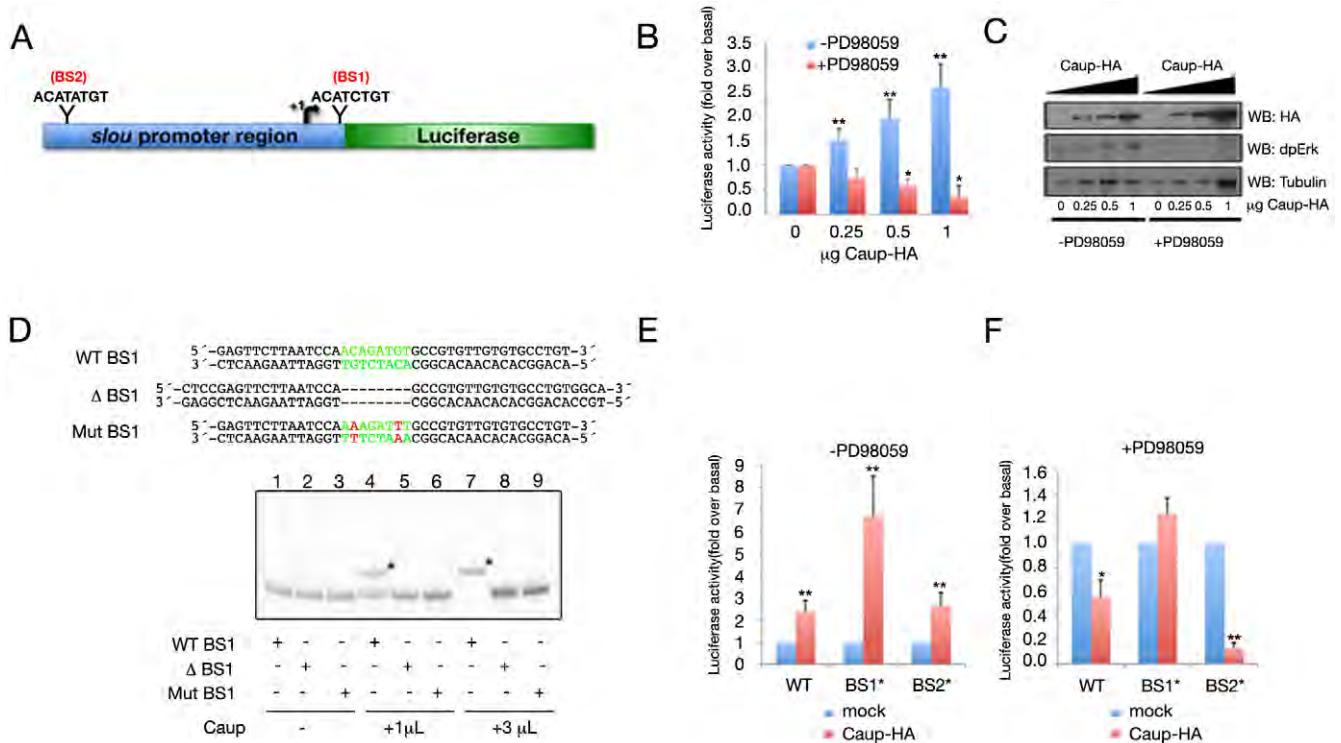


Figure 6. Direct interaction of Caup with *slou* regulatory region and its modulation by the Ras/MAPK pathway. (A) Diagram of the 2 Kb long *slou* promoter region (from -1828 to +153 nt) used to drive Luciferase expression. This fragment contains two putative binding sites for Ara/Caup, BS1 and BS2. (B) Effect of increasing amounts of Caup-HA on the Luciferase activity driven by *slou* promoter in the absence (blue bars) and presence (red bars) of PD98059 MEK1 inhibitor. (C) Representative western blots of lysates of S2 cells expressing increasing amounts of Caup (upper panel) in the absence and presence of PD98059, showing the state of activation of the Ras/MAPK cascade (middle panel) and Tubulin expression as loading control (lower panel). (D–F) Mutagenesis analysis of *slou* regulatory region. (D) Binding of Caup to the indicated *slou* regulatory fragments, containing BS1 determined by EMSA. Binding of Caup to wild-type fragment resulted in the formation of complexes with reduced mobility (asterisk in lane 4), which was more evident in the presence of increased amounts of Caup (asterisk in lane 7). No shift was observed when fragments devoid of BS1 (Δ BS1, lanes 5, 8) or point-mutated (Mut BS1, lanes 6, 9) were used or in the absence of Caup (lanes 1–3). (E, F) Effect of Caup-HA (1 μ g) on the Luciferase activity driven by wt and mutated (BS1*, BS2*) *slou* promoter regions in the absence (E) and presence (F) of PD98059 inhibitor. Statistical analyses for Luciferase assays were performed using the paired two-tailed Student's t-test. The data are presented as means \pm S.E.M. of 3 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared to basal (B) or wt (E, F) conditions. doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g006

depend on the binding of a MAPK-dependent phosphorylated protein, which we hypothesize might be Caup, to a so far unidentified binding site. Thus, the analysis in S2 cells confirmed the relevance of BS1, but not of BS2 on Caup-dependent regulation.

Additionally, we have analysed the evolutionary conservation of these putative Caup-BS among several *Drosophila* species (Figure S3). Notably, BS1 is located in a highly conserved region and its sequence is identical across the melanogaster group, whereas neither BS2 nor the adjacent sequences are conserved. These data further reinforce the relevance of BS1 for Caup-dependent *slou* regulation.

Our results are thus consistent with a direct effect of Caup on *slou* regulation. However, it cannot be ruled out the possibility of the existence in vivo of a transcription factor, acting downstream of *ara/caup*, that could repress *slou* through BS1 or through a still unidentified regulatory sequence of *slou*.

Caup integrates in vivo inputs from the Ras/MAPK cascade for its regulation of *slou*

To further examine in vivo the regulatory activity of Caup on *slou* (Figure 7B, 7C), we ectopically expressed *caup* or *ara* in VA1–3 using *Con-GAL4* and checked whether they would repress *slou* in the VA2 muscle. This was indeed the case (Figure 7B, 7D, 7F–7F''

and not shown). Loss of *slou* expression caused by ectopic *caup* reproduced the morphological defects in VA2 previously described in *slou* mutants (Figure 7F–7F'' and [17]). To analyse whether the morphological effect of Caup on muscle VA2 development was only due to Caup-dependent repression of *slou*, we forced the expression of both genes using the *Con-GAL4* driver. In this experimental condition Caup was unable to repress *UAS-slou* expression and the VA2 muscle and its morphology seemed unaffected (Figure 7F–7G'').

Once verified the repressor activity of Caup on *slou* during myogenesis, to analyse the regulatory potential of BS1 in vivo we generated transgenic flies harbouring the wild-type or the BS1 deleted version of the *slou* regulatory region. The wild-type regulatory region only partially reproduced the *slou* endogenous expression, as it drove *lacZ* expression in the CNS but not in the muscles (not shown and Figure S4). In contrast, the construct lacking BS1 behaved congruently with our S2 cells results, since it drove ectopic expression of *lacZ* in the lateral muscles (Figure S4). Curiously, up-regulation of *lacZ* was found in the 4 lateral muscles and not only in the ones that show *slou* expression in the absence of Ara/Caup (Figure 4B). Thus we interpret that this construct, while missing some of the regulatory sequences required for *slou* mesodermal expression, it contains those required for Caup mediated repression in the mesoderm. In addition, the absence of

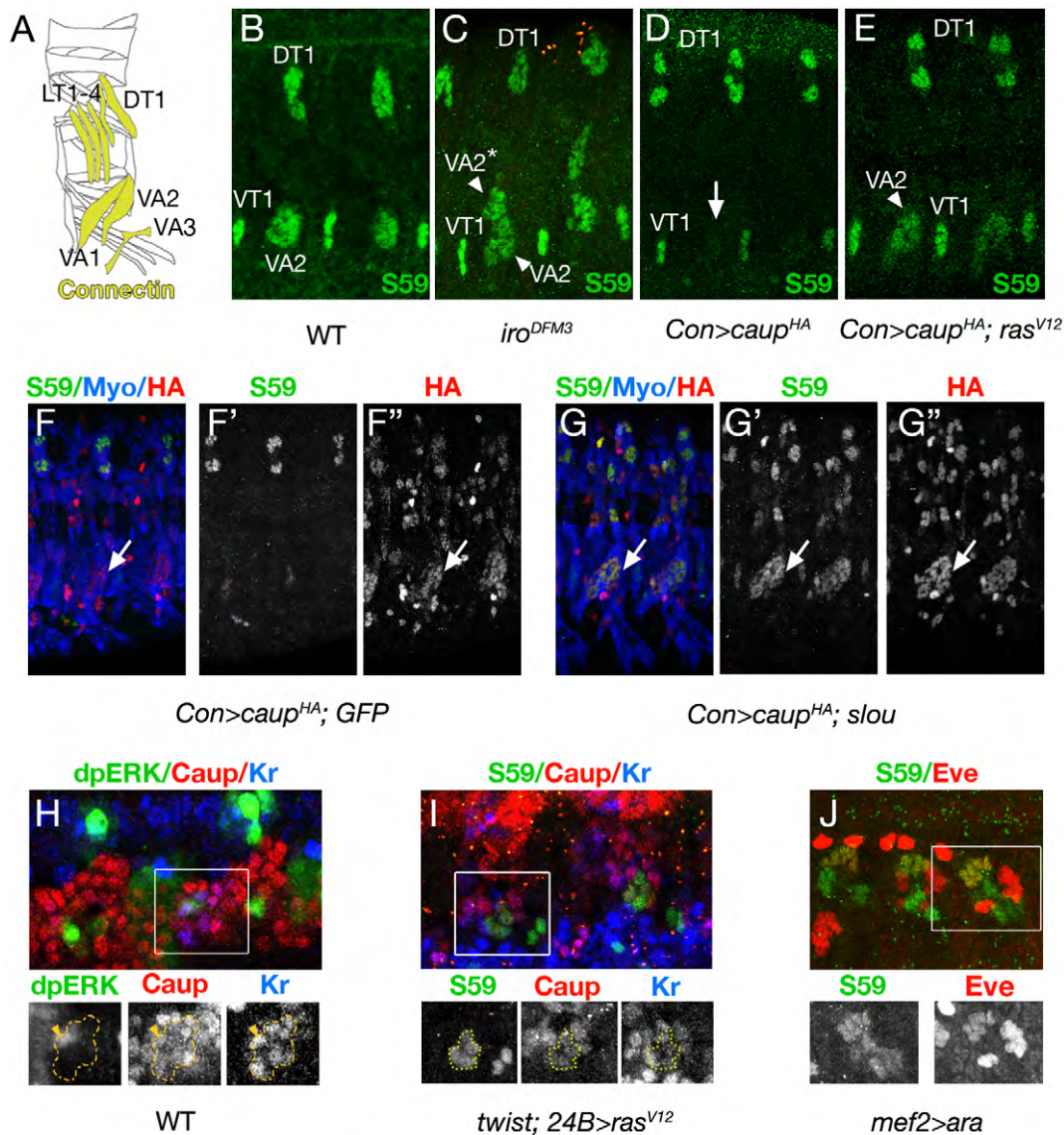


Figure 7. Ras/MAPK modulates the transcriptional activity of Caup on *slou* during myogenesis. (A) Schematic drawing of muscles expressing *Con* in abdominal hemisegments. (B–E) Lateral views of abdominal hemisegments of stage 15–16 wild type (B), *Df(3L)iro^{DFM3}* (C), *Con-GAL4::UAS-caup^{HA}* (D) and *Con-GAL4::UAS-caup^{HA}; UAS-ras^{V12}* (E) embryos, stained with S59 antibody. Note the presence of an ectopic VA2 muscle (VA2*) in *Df(3L)iro^{DFM3}* (C), the absence of *slou* in VA2 when *caup* is ectopically expressed in this muscle (arrow, D, see also F–F''), and the failure of Caup to repress *slou*/S59 in VA2 muscle in the presence of the activated form of Ras, *ras^{V12}* (E). (F–G'') Lateral views of stage 15–16 *Con-GAL4::UAS-caup^{HA}* and *Con-GAL4::UAS-caup^{HA}; UAS-slou* (G–G'') embryos stained with the indicated antibodies. Note that co-expression of *caup* and *slou* in VA2 does not appreciably modify the morphology of the muscle (arrows in G–G''). As an internal control co-expression of *UAS-caup* and *UAS-GFP* still repressed endogenous *slou* and prevented the VA2 fate (F–F''). (H) Close-up of a lateral transverse promuscular cluster (outlined) in a stage 11 wild-type embryo showing co-expression of Caup (red) and Kr (blue) in all cells of the clusters. Note that the activation of the Ras/MAPK cascade (dpErk, green) only takes place at low levels in the segregating progenitor (yellow arrowhead) but not in the rest of the cluster. (I) Close-up of LT cluster in *twist-GAL4; 24B-GAL4::UAS-ras^{V12}* stage 11 embryo. Early activation of the Ras/MAPK pathway prevents the repression of *slou* by Caup in the LT cluster. (J) Close-up of the dorsal mesoderm of a *mef2-GAL4::UAS-ara* stage 15 embryo showing ectopic expression of *slou* in *eve*-expressing muscles.

doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g007

strict correlation between the phenotypes of deletion of BS1 and lack of Ara/Caup, might indicate the ability of other transcription factor(s) to regulate *slou* expression in LT1–2 through BS1.

To investigate whether the effect of the MAPK cascade on the transcriptional activity of Ara/Caup found in the S2 cell assay is also at work during myogenesis we examined whether there is a correlation between MAPK signalling and Caup transcriptional regulatory activity. We looked at the state of activation of this pathway in the LT promuscular cluster, where Ara/Caup repress

slou, and found that it did not appreciably express dpErk (Figure 7H). Therefore, a repressor activity of Ara/Caup correlates in vivo with the absence of MAPK signalling. Next, we tested whether forced activation of the MAPK pathway in the mesoderm could interfere with the repressor activity of endogenous Caup in LT promuscular clusters. This was indeed the case, since activation of the MAPK pathway using *twist-GAL4; 24B-GAL4* to drive the activated form of Ras85D (*ras^{V12}* [49]) allowed co-expression of *caup* and *slou* in this cluster (Figure 7I). Similarly,

late co-expression of *ras*^{V12} and *caup* (*Con-Gal4* driver) blocked the repression activity of Caup on *slou* (Figure 7D and 7E). Finally, to test whether MAPK signalling not only prevented Caup-dependent repression of *slou* but also converted Caup from repressor to activator, we looked at the expression of *slou* after early pan-mesodermal *Caup* expression (*mef2-GAL4*). As shown in Figure 7J, Ara was indeed able to ectopically activate *slou* in *Drosophila* epidermal growth factor receptor (DER)-dependent *eve*-expressing muscles.

Discussion

The study of myogenesis in *Drosophila* has increased the understanding of how the mechanisms that underlie the acquisition of specific properties by individual muscles are integrated within the myogenic terminal differentiation pathway. Thus, the current hypothesis proposes that distinct combinations of regulatory inputs leads to the activation of specific sets of muscle identity genes in progenitors that regulate the expression of a battery of downstream target genes responsible for executing the different developmental programmes (reviewed in [2,10,38]). However, the analysis of the specific role of individual muscle identity genes and of their hierarchical relationships is far from complete since the characterisation of direct targets for these transcriptional regulators is very scarce [36,37].

Here, we report the identification of *ara* and *caup*, two members of the Iroquois complex, as novel type III muscle identity genes. We find that the homeodomain-containing Ara and Caup proteins are necessary for the specification of the LT fate. *ara/caup* appear to be bona fide muscle identity genes. Indeed, similarly to the identity genes *Kr* and *slou* [17,18], absence of *ara/caup* does not interfere with the segregation of muscle progenitors or their terminal differentiation, but modifies the specific characteristics of LT1–4 muscles, which are transformed towards VA1, VA2, LL1 and LL1 sib fates. These transformations may be due in part to the up-regulation of *slou* and *vg* in the corresponding muscles. Thus, a recent report [50] shows that forced expression of *vg* in LT muscles induces changes in muscle attachments similar to the ones observed in LT1 in *ara/caup* mutant embryos. However, it should be stressed that although in *ara/caup* mutants LT muscles are lost in more than 95% of cases, they are not completely transformed into perfect duplicates of the newly acquired fates. For instance, while the specific LT marker *lms* is lost in 91% of cases, ectopic *slou* expression is detected in only 75% of cases. These partial transformations might be due to differences in the signalling inputs acting in the mesodermal region from where these muscles segregate (see below). Our unpublished data also showed that forced pan-mesodermal expression of *ara/caup* alter the fates of many muscles both in dorsal and in ventral regions without converting them into LT muscles (i.e., they do not ectopically express *lms*). Similarly, *Kr* and *slou* ectopic expression is not sufficient to implement a certain muscle fate [17,18]. The failure to recreate a given muscle identity by adding just one of the relevant muscle identity proteins reveals the importance that cell context, that is, the specific combination of signalling inputs and gene regulators present in each cell, have in determining a specific muscle identity.

Our analysis of the myogenic requirement of *ara/caup* has revealed several features about how these genes act to implement LT fates. Thus, although they are expressed in six developing embryonic muscles, only four of them, LT1–4, are miss-specified in the absence of Ara/Caup. The remaining two, DT1 and SBM, seem to develop correctly, according to morphological as well as molecular criteria. It is worth noting that the requirement for *ara/caup* genes in these six muscles correlates with the onset of their expression. Thus, in the affected LT1–4 muscles Ara/Caup can be

first detected at the earliest step of muscle lineages, that is in the promuscular clusters. In contrast, in the unaffected muscles *ara/caup* start to be expressed later, in the DT1/DO3 progenitor and the SBM founder. This suggests that in muscle lineages *ara/caup* have to be expressed very early to repress *slou* and *vg* to implement the LT fate. Several data support this interpretation. For instance, the observation that *ara/caup* are co-expressed with *slou* in DT1, whereas they repress *slou* in LT3–4, may be related to the fact that *slou* expression precedes that of *ara/caup* in the DT1 lineage. Should this be so, one would expect that ectopic expression of *ara* using the early driver *mef2-GAL4*, would repress *slou* in DT1, as it actually does (Figure S5), whereas this repression is not evident using the late driver *Con-GAL4*. Furthermore, the hypothesis of the relevance of the timing of muscle identity gene expression for muscle fate specification might also apply to the case of *slou*, where a similar correlation between the strength of the loss-of-function *slou* phenotypes in specific muscles and the onset of *slou* expression has also been found [17].

It should be stressed that the generation of the LT code depends not only on the early presence of Ara/Caup on the promuscular clusters but also on the absence (or strong reduction) of DER/Ras activity at that precise developmental stage and location (Figure 8). There is a dynamic regulation of MAPK signalling in the lateral mesoderm. Caup-expressing muscles develop from DER-independent clusters whereas the duplicated muscles observed in *ara/caup* mutants derive from progenitors that segregate very near the LT progenitors [3], but originate in DER-dependent promuscular clusters that are specified slightly later in development [4,51]. Furthermore we have observed both by in vivo and in cell culture that low MAPK activity is required for Caup-dependent *slou* repression. Therefore, we interpret the role of Ara/Caup in the implementation of LT fate as follows (Figure 8). At mid stage 11 in the myogenic mesoderm, groups of mesodermal cells acquire myogenic competence as a result of interpreting a combinatorial signalling code that reflects their position along the main body axes, as well as the state of activation of different signalling pathways [4]. Accordingly, these clusters initiate the expression of *lethal of scute* and a unique code of muscle identity genes, as has been shown in great detail for *eve* expression in the dorsal mesoderm [34,35]. In the case of the dorso-lateral mesoderm this code includes *ara/caup* and *Kr* and implements the LT fate. Since the level of activation of the Ras/MAPK cascade is low in these clusters, Ara/Caup will behave as transcriptional repressors, preventing the activation of *slou* or *vg* in LT1–2 and LT3–4 clusters, which would be otherwise activated in this location. Thus, Ara/Caup implement the LT fate by repressing the execution of the alternative fates (*Kr+*, *Slou+*, *Con+*, *Poxm+* and *Kr+*, *Vg+*) that would give rise to duplicates of *P_{VA1/VA2}* and *P_{LL1/LL1sib}*, respectively, and by allowing a different identity gene code (*Kr+*, *Caup+*, *Con+*, *lms+*) that generates the LT fate.

Slightly later the Ras/MAPK pathway becomes active at the dorsolateral region (Figure 8). This changes the combinatorial signalling code and coincides with a change in the muscle identity genes expressed by the promuscular clusters that segregate from this position, which now accumulate *Kr* but not Ara/Caup. Progenitors born from them will express either *slou* or *vg* and give rise to VA1–2 and LL1/LL1sib fates, all DER-dependent [51].

Our S2 cells experiments suggest a molecular mechanism by which the Ras/MAPK pathway modulates the transcriptional activity of Ara/Caup on *slou*. Thus, low MAPK activity and direct binding of Caup to BS1 site of the *slou* gene would favour strong repression of *slou*. BS1 could be embedded in a silencer regulatory element or its binding to Caup may block transcription of the downstream located *luciferase* gene. On the contrary, Caup-

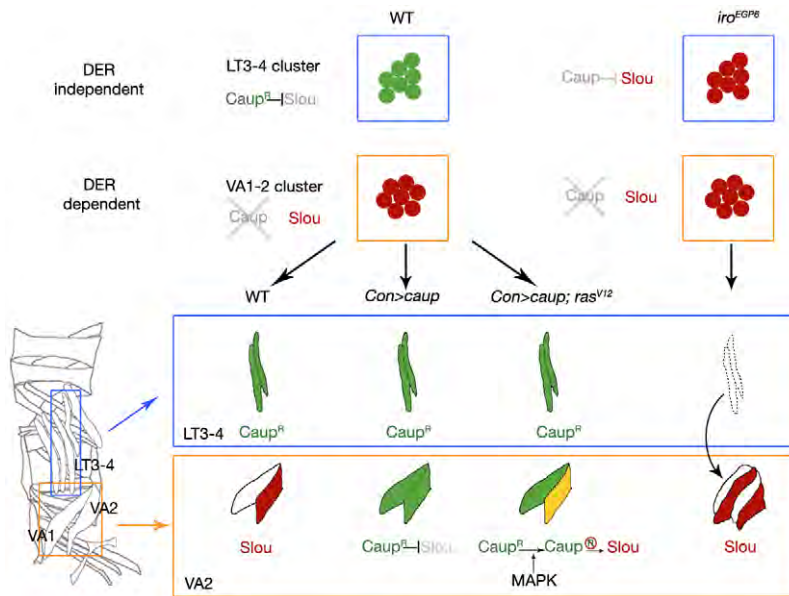


Figure 8. Effect of the state of activation of the Ras/MAPK signalling cascade on the regulation of *slou* by Ara/Caup in LT and VA lineages. In the wild-type LT3–4 promuscular cluster, where Ras/MAPK signalling is inactive, Caup represses *slou* since in embryos mutant for *ara/caup* (*Df(3L)iro^{EGP6}*), the absence of Caup allows *slou* activation in this cluster and the consequent transformation of LT3–4 muscles to VA1–2 muscles. In the wild-type Caup is absent from the DER-dependent VA1–2 cluster that expresses *slou*. Ectopic expression of Caup in the VA1–2 lineages using *Con>GAL4* (active after founder segregation when MAPK signalling is extinguished) represses *slou* in VA2. On the contrary, *Con>GAL4* driven expression of Caup together with the activated form of Ras alleviates Caup-dependent *slou* repression in the VA2 muscle.
doi:10.1371/journal.pgen.1002186.g008

dependent activation of *slou* would be dependent on MAPK signalling. We hypothesize that MAPK-dependent Caup phosphorylation could modulate its interaction with different transcriptional co-factors or/and its binding site affinity.

Furthermore, our *in vivo* evidence indicates a repressor function of presumably non-phosphorylated Caup on *slou* since forced activation of the Ras pathway allows co-expression of *slou* and *caup*. On the other hand, the ectopic expression of *slou* induced by *caup*-over-expression is suggestive of a possible activator function of phosphorylated Caup.

The role of IRO proteins in cell fate specification is conserved in both vertebrates and invertebrates (reviewed in [52]). Here we have shown that the interplay between MAPK signalling and IRO activity found in vertebrate neuroepithelium [48] is also at work in *Drosophila* myogenesis. We have also identified a potential direct target of Ara/Caup, *slou* and propose *vg* as a candidate gene to be regulated by Ara/Caup. In both cases the genes subordinated to *ara/caup* encode transcription factors that might in turn regulate the expression of other genes, genes that must be repressed in LT muscles in order to acquire the LT fate. These results, therefore, provide insights into the way Ara/Caup control lateral muscle identity and on the role of signalling pathway inputs to modulate the activity of these transcription factors, with consequences in their downstream targets. It also highlights the importance that the specific combination of muscle identity genes, their hierarchical relationships and their temporal activation have in determining the identity of a given muscle cell, very alike to what is at work during the acquisition of neural fates [53].

Materials and Methods

Drosophila stocks

The following stocks were used: *Df(3L)iro^{DFM3}*, *ara^{rF209}* [28], *Df(2L)5* [54], *Df(3L)iro^{EGP5}*, *Df(3L)iro^{EGP1}* [42], *rP298* [32], *mef2-GAL4* [55], *Con-GAL4* [56], *twist-GAL4*; *24B-GAL4*

4 (a gift from M. Baylies), *UAS-ara*, *UAS-caup* [28], *UAS-caup-HA* (N. Barrios, unpublished) and *UAS-ras^{V12}* [49]. Ectopic expression was generated by means of the GAL4/UAS system [57].

In situ hybridisation, immunohistochemistry, and microscopy

Whole-mount *in situ* hybridisation with digoxigenin-labelled RNA probes and immunocytochemistry were performed as described previously [58]. Stained embryos were embedded in Araldite and sectioned (3 μ m) following standard procedures. The following primary antibodies were used at the indicated dilutions: rat anti-Caup (1:50) [23], guinea pig anti-Kr (1:500) [59], mouse anti-Lb (1:1) [15], rabbit anti-Poxm (1:10) [14], rat and rabbit S59 (that recognises Slou, 1:50) [3], rabbit anti-Alien (1:500) [60], mouse anti-Con (1:10) [61], rabbit anti-Vg (1:500) [62], rat anti-Tropomyosin (MAC141; 1:100; Babraham Tech), rabbit anti-Myosin (Myo; 1:300) [63], rat anti-HA (1:1000; Roche); rabbit anti- β -Gal (1:5000; Cappel) and mouse anti-dpErk (1:50; Sigma). Images were obtained with confocal microscopes MicroRadian (BioRad) and LSM510META (Zeiss) and analysed using the software Zeiss LSM Image or LaserSharp and Adobe Photoshop 7.0. In most cases the figures correspond to z-projections of series of confocal sections.

Cell culture and transfections

The 5'-upstream region of *slou* (from -1828 to +153 nt) was amplified via PCR and cloned in pGLHS43 vector, a modified version of the pGL2-basic vector (Luciferase reporter plasmid, Promega), obtained after substitution of the SV40 promoter by the *Drosophila* heat-shock 43 minimal promoter (a gift from A. Baonza). The putative Caup BS1 and BS2 were deleted using the "Quick Change" site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Santa Clara, CA). The sequences of the primers used to delete BS1 were 5'-GAGTTCCTTAATCCAGCCGTGTTGTGTGCCTGTGGCA-AGTCAATAG-3' and its reverse complement and for BS2, 5'-

CCATATACATATGTGTGCATGTATGCATAAGTGTGAG-TGTGAGTGGG -3' and its reverse complement. pAC5.1-Caup-HA plasmid was obtained after cloning *caup* ORF with an HA tag in the *Drosophila* expression vector pAC5.1 (Invitrogen). *Drosophila* S2 cells were cultured in Insect-Xpress medium (Lonza) supplemented with 7% fetal bovine serum and grown at 25°C. For Luciferase assays S2 cells were seeded at a density of 2×10^6 and co-transfected with 1 µg of the different firefly Luciferase reporter constructs DNA, 30 ng of control plasmid (expressing Renilla Luciferase driven by the promoter of *Drosophila* RpIII128, [64]) and either 0, 0.25, 0.5 or 1 µg of pAC5.1-Caupolican-HA plasmid per well using Nucleofector Technology (Lonza). Luciferase activity in the cell extracts was measured using Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) following the manufacturer's protocol. Briefly, 20 µl extract was added to 100 µl F-luc assay reagent, mixed gently for 5 s and placed in a luminometer. After counting F-luc activity for 10 s, 100 µl stop-and-glo reagent was added to the tube, mixed gently for 5 s and placed in the luminometer for R-luc count. The R-luc activities were used as internal control to correct for the difference in transfection efficiency of different reporter plasmids. Therefore, F-Luc/R-Luc activities were used for data analysis. To investigate whether the MEK/ERK pathway was involved in transcriptional regulation driven by the *slou* promoter, S2 cells were treated or not with 50 µM PD-98059 (Sigma) for 2 hrs before Luciferase activity measurement. All data reported are means from three or four independent experiments, each performed in triplicates. Primary antibodies used in immunoblots were mouse anti-dpErk (1 µg/ml; Sigma), rat anti-HA (200 ng/ml; Roche) and mouse anti-βtubulin (1:5000; Developmental Studies Hybridoma Bank).

Generation of *slou* reporter transgenic lines

The 5'-upstream region of *slou* used in S2 cells in the Luciferase reporter assays (both the wild type sequence and that missing the putative Caup BS1) were subcloned at the EcoRI site of the C4PLZ enhancer tester plasmid that contains a weak P-element promoter [65]. These *lacZ* reporter plasmids were introduced into *y w¹¹¹⁸* embryos by standard P-element transformation.

Electrophoretic mobility shift assay

Caup binding ability to the *slou* promoter region was analyzed by EMSA. Pairs of single-stranded, Cyc3 and unlabeled 40-mer oligonucleotides containing the wild-type putative Caup binding sites BS1, BS2 and their mutant or deleted versions were allowed to anneal to generate double-stranded probes. Sequences of primers are shown in Figure 6D for BS1 and in Dataset S1. Caup protein was synthesized *in vitro* by using the coupled transcription/translation rabbit reticulocyte lysate system (TNT Promega). The indicated amount of µl of TNT reaction mixture was incubated with 20 ng of labelled probe. Protein-DNA complexes were allowed to form at room temperature for 30 min in a total volume of 20 µl of binding buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl and 1 mM DTT). After incubation, free DNA and protein-DNA complexes were resolved by 6% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Gel fluorescence was analyzed in a Typhoon Scanner (GE healthcare).

Supporting Information

Dataset S1 Sequences of primers used in EMSA to analyse binding of Caup to BS2. Pairs of 40-mer oligonucleotides containing the wild-type putative Caup binding sites BS2 and their mutant or deleted versions are shown. (DOCX)

Figure S1 Pattern of expression of muscle marker genes in *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos. (A–D) RNA in situ hybridisation with *bms* probes of stage 13 (A, B) and stage 15 (C, D) *yw* (A, C) and *Df(3L)iro^{DFM3}* (B, D) embryos, showing the normal early onset of *bms* expression in the lateral region of abdominal segments in the mutant embryos (B, compare to A) and its absence of expression at later stages (D, compare to C). (E, F) Lateral view of stage 14 *yw* (E) and *Df(3L)iro^{DFM3}* (F) embryos stained with anti-Con antibodies, showing the absence of *Con*-expressing lateral muscles (asterisk in F) and the presence of *Con*-expressing DT1, VA2 and ectopic VA2 (VA2* in F) in *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos (F, compare to E). (G, H) Lateral view of stage 15 *yw* (G) and *Df(3L)iro^{DFM3}* (H) embryos stained with anti-Lb antibodies to show the presence of *lb*-expressing SMB in *Df(3L)iro^{DFM3}* embryos (H, compare to G). (TIF)

Figure S2 Regulation of *caup* expression during embryogenesis. (A, B) Lateral view of stage 15 wild-type (A) and *Df(2L)5* (B) embryos stained with anti-Alien (green) and anti-Caup (red). Note that in *Df(2L)5* embryos despite the absence of Caup ectodermal expression (asterisk in A), apodema specification (labelled by Alien) and Caup mesodermal expression (arrowheads) are indistinguishable from wild-type embryos. (TIF)

Figure S3 Caup BS1 but not BS2 of *slou* cis-regulatory region is evolutionary conserved between *Drosophila* species in the *melanogaster* group. The *slou* cis-regulatory region used in this study was compared between drosophilids using the VISTA Browser tool of VISTA tools for comparative genomics (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). We found a high degree of similarity in this region between *D. melanogaster* and other members of the *melanogaster* subgroup (*D. simulans*, *D. yakuba* and *D. erecta*) and only partial similarity with more distant species like *D. ananassae* (*melanogaster* group) and *D. pseudoobscura* (*obscura* group). BS1 is located in a highly conserved region and its sequence is identical across the *melanogaster* group, whereas BS2 is located in a region of low conservation and not found in any of the related species. Significant similarities on *slou* coding and cis regulatory regions were only found between *Drosophila melanogaster* and the closer drosophilid species *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. erecta* and *D. ananassae*. No homology was found using the BLAST tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*. (TIF)

Figure S4 Deletion of Caup BS1 promotes *lacZ* expression in LT muscles driven by *slou* cis-regulatory region. Lateral views of stage 15 *slou-lacZ* (A, A') and *ΔBS1-slou-lacZ* (B, B') embryos stained with anti-Caup (green), anti-βgal (red) and anti-Myo (blue) antibodies. Note absence of *lacZ* expression in LT muscles of *slou-lacZ* embryos (arrows in A, A') and co-expression of *caup* and *lacZ* in LT muscles of *ΔBS1-slou-lacZ* embryos (arrows in B, B'). (TIF)

Figure S5 Repression of *slou* by ectopic expression of Ara. Lateral views of stage 15 wild-type (A) and *mef2-GAL4::UAS-ara* (B–B') embryos stained with anti-Tropomyosin (red) and anti-*slou* (green) antibodies. (A) Note *slou* expression in DT1, VA2 and VT1 muscles (arrows). (B) Early expression of *ara* with the panmesodermal driver *mef2-GAL4* represses *slou* in DT1, VA2 and VT1 in many segments (arrows). A few muscles maintain *slou* expression (asterisks). (TIF)

Acknowledgments

We are grateful to J. Modolell, J.F. de Celis, J.L. Gómez-Skarmeta, and members of our laboratories for helpful discussions and constructive criticism on the manuscript. We thank Sonia Velazquez for technical assistance; Eva Caminero and Mar Casado from the CONSOLIDER transgenic and stock platforms for their technical support; and A. Baonza,

M. Calleja, S. Carroll, M. Noll, D. Kosman, D. Kiehart, M. Baylies, and K. Jagla for contributing reagents, antisera, and flies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MC-R AST SC MR-G. Performed the experiments: MC-R AST SP-S EG-P NB AL PM MR-G. Analyzed the data: MC-R AST SC MR-G. Wrote the paper: SC MR-G.

References

- Bate M (1993) The mesoderm and its derivatives; Martinez-Arias MBaA, ed. Cold Spring Harbor New York: CHS Laboratory Press. pp 1013–1090.
- Baylies MK, Bate M, Ruiz Gomez M (1998) Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* 93: 921–927.
- Carmena A, Bate M, Jimenez F (1995) Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9: 2373–2383.
- Carmena A, Gisselbrecht S, Harrison J, Jimenez F, Michelson AM (1998) Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* 12: 3910–3922.
- Carmena A, Murugasu-Oei B, Menon D, Jimenez F, Chia W (1998) Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* 12: 304–315.
- Ruiz-Gómez M, Bate M (1997) Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* 124: 4857–4866.
- Duan H, Skeath JB, Nguyen HT (2001) *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128: 4489–4500.
- Furlong EE, Andersen EC, Null B, White KP, Scott MP (2001) Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science* 293: 1629–1633.
- Ruiz-Gómez M, Coutts N, Suster ML, Landgraf M, Bate M (2002) myoblasts incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development* 129: 133–141.
- Baylies MK, Michelson AM (2001) Invertebrate myogenesis: looking back to the future of muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 11: 431–439.
- Tixier V, Bataille L, Jagla K (2010) Diversification of muscle types: recent insights from *Drosophila*. *Exp Cell Res* 316: 3019–3027.
- Rushton E, Drysdale R, Abmayr SM, Michelson AM, Bate M (1995) Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 121: 1979–1988.
- Bourgouin C, Lundgren SE, Thomas JB (1992) *Apterous* is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9: 549–561.
- Duan H, Zhang C, Chen J, Sink H, Frei E, et al. (2007) A key role of Pox meso in somatic myogenesis of *Drosophila*. *Development* 134: 3985–3997.
- Jagla T, Bellard F, Lutz Y, Dretzen G, Bellard M, et al. (1998) ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* 125: 3699–3708.
- Crozatier M, Vincent A (1999) Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to notch signalling. *Development* 126: 1495–1504.
- Knirr S, Azpiazu N, Frasch M (1999) The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning. *Development* 126: 4525–4535.
- Ruiz-Gómez M, Romani S, Hartmann C, Jackle H, Bate M (1997) Specific muscle identities are regulated by Kruppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 124: 3407–3414.
- Bate M, Rushton E, Frasch M (1993) A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Dev Suppl*. pp 149–161.
- Nose A, Mahajan VB, Goodman CS (1992) Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70: 553–567.
- Gomez-Skarmeta JL, Modolell J (2002) Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr Opin Genet Dev* 12: 403–408.
- Cavodeassi F, Modolell J, Campuzano S (2000) The Iroquois homeobox genes function as dorsal selectors in the *Drosophila* head. *Development* 127: 1921–1929.
- Diez del Corral R, Aroca P, JL Gm-S, Cavodeassi F, Modolell J (1999) The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev* 13: 1754–1761.
- Feijoo CG, Manzanera M, de la Calle-Mustienes E, Gomez-Skarmeta JL, Allende ML (2004) The *Irx* gene family in zebrafish: genomic structure, evolution and initial characterization of *irx5b*. *Dev Genes Evol* 214: 277–284.
- Cavodeassi F, Diez Del Corral R, Campuzano S, Dominguez M (1999) Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* 126: 4933–4942.
- Glavic A, Gomez-Skarmeta JL, Mayor R (2002) The homeoprotein Xiro1 is required for midbrain-hindbrain boundary formation. *Development* 129: 1609–1621.
- Gomez-Skarmeta J, de La Calle-Mustienes E, Modolell J (2001) The Wnt-activated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4. *Development* 128: 551–560.
- Gomez-Skarmeta JL, Diez del Corral R, de la Calle-Mustienes E, Ferre-Marco D, Modolell J (1996) Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85: 95–105.
- Leyns L, Gomez-Skarmeta JL, Dambly-Chaudiere C (1996) iroquois: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech Dev* 59: 63–72.
- Rodriguez-Seguel E, Alarcon P, Gomez-Skarmeta JL (2009) The *Xenopus* *Irx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Foxf* and *Arx*. *Dev Biol* 329: 258–268.
- Michelson AM, Abmayr SM, Bate M, Arias AM, Maniatis T (1990) Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 4: 2086–2097.
- Nose A, Ishihiki T, Takeichi M (1998) Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the msh homeobox gene. *Development* 125: 215–223.
- Dubois L, Enriquez J, Daburon V, Crozet F, Lebreton G, et al. (2007) Collier transcription in a single *Drosophila* muscle lineage: the combinatorial control of muscle identity. *Development* 134: 4347–4355.
- Knirr S, Frasch M (2001) Molecular integration of inductive and mesoderm-intrinsic inputs governs even-skipped enhancer activity in a subset of pericardial and dorsal muscle progenitors. *Dev Biol* 238: 13–26.
- Philippakis AA, Busser BW, Gisselbrecht SS, He FS, Estrada B, et al. (2006) Expression-guided in silico evaluation of candidate cis regulatory codes for *Drosophila* muscle founder cells. *PLoS Comput Biol* 2: e53. doi:10.1371/journal.pcbi.0020053.
- Hartmann C, Landgraf M, Bate M, Jackle H (1997) Kruppel target gene knockout participates in the proper innervation of a specific set of *Drosophila* larval muscles. *Embo J* 16: 5299–5309.
- Junion G, Bataille L, Jagla T, Da Ponte JP, Tapin R, et al. (2007) Genome-wide view of cell fate specification: ladybird acts at multiple levels during diversification of muscle and heart precursors. *Genes Dev* 21: 3163–3180.
- Bataille L, Delon I, Da Ponte JP, Brown NH, Jagla K (2010) Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev Cell* 19: 317–328.
- Calleja M, Herranz H, Estella C, Casal J, Lawrence P, et al. (2000) Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of *Drosophila*. *Development* 127: 3971–3980.
- Letizia A, Barrio R, Campuzano S (2007) Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the iroquois genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* 134: 1337–1346.
- McNeill H, Yang CH, Brodsky M, Ungos J, Simon MA (1997) mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* 11: 1073–1082.
- González-Pérez E (2009) Función y regulación de las homeoproteínas del complejo génico Iroquois en los discos imaginales de ala y ojo-antena de *Drosophila* melanogaster. Madrid: Autónoma de Madrid. 146 p.
- Muller D, Jagla T, Bodart LM, Jahrling N, Dodt HU, et al. (2010) Regulation and functions of the *lms* homeobox gene during development of embryonic lateral transverse muscles and direct flight muscles in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5: e14323. doi:10.1371/journal.pone.0014323.
- Herranz H (2001) Estudio de la función del gen pannier en el desarrollo embrionario de *Drosophila* melanogaster. Madrid: Autónoma de Madrid. 79 p.
- Ruiz-Gómez M, Coutts N, Price A, Taylor MV, Bate M (2000) *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102: 189–198.
- Kim SJ, Park T, Lee KK (1999) Identification of a novel cis-acting positive element responsible for the cell-specific expression of the NK-1 homeobox gene. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 538–544.
- Bilioni A, Craig G, Hill C, McNeill H (2005) Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14671–14676.
- Matsumoto K, Nishihara S, Kamimura M, Shiraishi T, Otaguro T, et al. (2004) The prepattern transcription factor *Irx2*, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nat Neurosci* 7: 605–612.
- Lee T, Feig L, Montell DJ (1996) Two distinct roles for Ras in a developmentally regulated cell migration. *Development* 122: 409–418.

50. Deng H, Bell JB, Simmonds AJ (2010) Vestigial is required during late-stage muscle differentiation in *Drosophila melanogaster* embryos. *Mol Biol Cell* 21: 3304–3316.
51. Buff E, Carmena A, Gisselbrecht S, Jimenez F, Michelson AM (1998) Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development* 125: 2075–2086.
52. Cavodeassi F, Modolell J, Gomez-Skarmeta JL (2001) The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development* 128: 2847–2855.
53. Baumgardt M, Miguel-Aliaga I, Karlsson D, Ekman H, Thor S (2007) Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. *PLoS Biol* 5: e37. doi:10.1371/journal.pbio.0050037.
54. de Celis JF, Barrio R, Kafatos FC (1996) A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* 381: 421–424.
55. Ranganayakulu G, Elliott DA, Harvey RP, Olson EN (1998) Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice. *Development* 125: 3037–3048.
56. Calleja M, Moreno E, Pelaz S, Morata G (1996) Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274: 252–255.
57. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401–415.
58. Martin BS, Ruiz-Gomez M, Landgraf M, Bate M (2001) A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development* 128: 3331–3338.
59. Kosman D, Small S, Reinitz J (1998) Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins. *Dev Genes Evol* 208: 290–294.
60. Goubeaud A, Knirr S, Renkawitz-Pohl R, Paululat A (1996) The *Drosophila* gene *alien* is expressed in the muscle attachment sites during embryogenesis and encodes a protein highly conserved between plants, *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* 57: 59–68.
61. Meadows LA, Gell D, Broadie K, Gould AP, White RA (1994) The cell adhesion molecule, connectin, and the development of the *Drosophila* neuromuscular system. *J Cell Sci* 107(Pt 1): 321–328.
62. Williams JA, Bell JB, Carroll SB (1991) Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev* 5: 2481–2495.
63. Kiehart DP, Feghali R (1986) Cytoplasmic myosin from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 103: 1517–1525.
64. Gilchrist DA, Nechaev S, Lee C, Ghosh SK, Collins JB, et al. (2008) NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev* 22: 1921–1933.
65. Wharton KA, Jr., Crews ST (1993) CNS midline enhancers of the *Drosophila* slit and Toll genes. *Mech Dev* 40: 141–154.